

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



TESIS DOCTORAL

Desarrollo de protocolos bioseguros de edición génica para la corrección de la epidermólisis bullosa distrófica recesiva

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Cristina Chamorro Poyo

DIRECTORES

Rodolfo Murillas Angoiti
Fernando Larcher Laguzzi

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



**DESARROLLO DE PROTOCOLOS BIOSEGUROS DE
EDICIÓN GÉNICA PARA LA CORRECCIÓN DE LA
EPIDERMOLISIS BULLOSA DISTRÓFICA RECESIVA**

TESIS DOCTORAL DE:
CRISTINA CHAMORRO POYO

BAJO LA DIRECCIÓN DE:
RODOLFO MURILLAS ANGOITI
FERNANDO LARCHER LAGUZZI

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



**DESARROLLO DE PROTOCOLOS BIOSEGUROS DE
EDICIÓN GÉNICA PARA LA CORRECCIÓN DE LA
EPIDERMOLISIS BULLOSA DISTRÓFICA RECESIVA**

CRISTINA CHAMORRO POYO
TESIS DOCTORAL
Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



**DESARROLLO DE PROTOCOLOS BIOSEGUROS DE
EDICIÓN GÉNICA PARA LA CORRECCIÓN DE LA
EPIDERMOLISIS BULLOSA DISTRÓFICA RECESIVA**

Memoria presentada por **Cristina Chamorro Poyo** para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid

Vº Bº directores de tesis

Dr. Rodolfo Murillas Angoit

Dr. Fernando Larcher Laguzzi

CRISTINA CHAMORRO POYO
TESIS DOCTORAL
Madrid, 2016

El presente trabajo de investigación ha sido realizado en la División de Biomedicina Epitelial CIEMAT- CIBERER CB06/07/0019, Departamento de Bioingeniería e Ingeniería Aeroespacial de la Universidad Carlos III de Madrid y Fundación Instituto de Investigación Sanitaria de la Fundación Jiménez Díaz, bajo la dirección de los Dres. Rodolfo Murillas Angoití y Fernando Larcher Laguzzi.

Cristina Chamorro Poyo ha disfrutado de una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador concedida por el CIEMAT.



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE ECONOMÍA, INDUSTRIA
Y COMPETITIVIDAD



Universidad
Carlos III de Madrid



A mis padres.

A Pablo.

A Carlota.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo. Esta tesis es fruto de la colaboración de muchas personas, unas con su trabajo, otras con su empuje y otras con su apoyo personal, sin los cuales esta tesis no hubiera sido posible. Gracias a todos ellos.

Mi primer agradecimiento es para mis directores de tesis, Dr. Fernando Larcher y Dr. Rodolfo Murillas, por la orientación, el seguimiento y la supervisión de la misma, pero sobre todo por la motivación, el apoyo y las enseñanzas recibidas a lo largo de estos años. Gracias a los dos por confiar en mi trabajo y valorarlo. También a la Dra. Marcela del Río, por darme la oportunidad de integrarme al equipo investigador, por confiar en mí desde el primer momento.

También quiero dar las gracias a mis compañeros de laboratorio y de almuerzos:

A Blanca, por sus actitudes profesionales y humanas, por el trabajo y el esfuerzo dedicado. Por su ayuda incondicional. Por su comprensión, disponibilidad, positivismo, consejos y amplios conocimientos que ha conseguido transmitirme. Muchas gracias.

A Ángeles, por todo lo que he aprendido trabajando a su lado. A Marta García, siempre dispuesta a ayudarme, aconsejarme y a enseñarme. A Marta Carretero, gracias por su ayuda inicial con los adenovirus. A Sara, por ser tan agradable y preocuparse por el avance de la tesis. A Almudena, por sus lecciones de cultivos. A Nuria, por sus rápidas gestiones para conseguirme los productos que necesitaba lo antes posible. A Claudio, Carlos, Lucía, María José y Adela, aunque no nos veamos mucho por el CIEMAT, siempre disfruto los breves momentos que puedo compartir con vosotros. A María, la nueva incorporación, a la que aún no he tenido tiempo de conocer lo suficiente, pero con la que espero poder compartir buenos momentos profesionales.

A Victoria, José, Verónica y Esteban, ¡ánimo y mucha suerte con vuestras tesis!

Por supuesto, no puedo olvidarme de todas las personas que han estado en el laboratorio durante más o menos tiempo a lo largo de estos 5 años porque de todos vosotros he aprendido algo: Chema, Sergio, Carol, Rosa, Luisa y en especial a Eli, le deseo lo mejor a nivel personal y profesional.

Al grupo de Hematopoyesis y de Oncología Molecular, en especial, a mis compañeros del laboratorio grande: gracias Cristian, José, Carol y Cristina por vuestros ánimos en la recta final de la escritura de la tesis. Al personal de histología: Kiko y Pilar.

Al Dr. Fulvio Mavilio, un especial agradecimiento primero por haberme recibido en su grupo de investigación, en París. Segundo, por haberme posibilitado la experiencia de vivir y descubrir esta maravillosa ciudad. Han sido unos meses inolvidables. A la Dra. Florence Le Roy, la persona que más tiempo me dedicó desinteresadamente durante mi estancia y más se interesó por mis investigaciones; *je veux te remercier pour ton aide et ton intérêt pour me faire sentir une de votre equipe.*

A mi familia, el componente afectivo imprescindible para conseguir cualquier meta y a los que estoy profundamente agradecida. A mis padres, por su apoyo y por la confianza que siempre han demostrado en mí, porque me han apoyado siempre en todo, por enseñarme a luchar por lo que yo quería. En estos años han sido un apoyo muy grande y porque me han hecho ver lo orgullosos que se sienten de mí por haber conseguido lo que siempre he querido. A mi abuelo, porque a sus 101 años, me sigue preguntando cuando voy a dejar de estudiar. A Pablo, gracias por estar incondicionalmente siempre a mi lado, animándome siempre a continuar. Por todos los esfuerzos que ha hecho, por toda su ayuda y, principalmente, por hacerme feliz. A su familia, por tratarme con tantísimo cariño. Espero que todos tengáis presente que sin vuestro apoyo, esto no hubiese sido posible.

A todos, mi más sincero agradecimiento.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN / ABSTRACT	7
I. INTRODUCCIÓN	11
1. LA PIEL	13
1.1. Estructura de la piel humana	13
1.2. Células Madre Epidérmicas (CME)	14
1.3. La unión dermo-epidérmica	16
1.4. Colágeno tipo VII	17
1.4.1. Biología del colágeno VII	18
1.4.2. Biosíntesis de colágeno VII y formación de las fibrillas de anclaje	19
2. GENODERMATOSIS: ENFERMEDADES DE LA PIEL DE ORIGEN GENÉTICO	20
2.1. Epidermolisis Bullosa (EB)	20
2.1.1. Epidermolisis Bullosa Distrófica (EBD)	21
2.1.2. La mutación c.6527insC del gen COL7A1	22
3. APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS EN EBDR	23
3.1. Terapia proteica	23
3.2. Terapia celular alogénica	24
3.3. Terapia génica	25
3.3.1. Vectores no virales	25
3.3.2. Transducción mediada por vectores virales	26
3.3.3. Edición génica	28
3.3.4. Vectores virales para la introducción de herramientas de edición génica	36
II. OBJETIVOS	43
III. MATERIALES Y MÉTODOS	45
1. Obtención de queratinocitos primarios de paciente	47
2. Cultivo de queratinocitos humanos	47
3. Extracción de ADN	48
3.1. ADN genómico	48
3.2. ADN plasmídico	48
3.3. ADN adenoviral	48
4. Inmortalización de queratinocitos de paciente EBDR	48
5. Ensayos de proliferación celular y clonogenicidad	49
6. Detección de la mutación c.6527insC por PCR-RFLP	49
7. Diferenciación de queratinocitos en cultivo inducida por calcio	50
8. Ensayo de tumorigénesis <i>in vivo</i>	50
9. Cariotipo espectral multicolor (SKY)	50
10. Transducción de queratinocitos con el vector retroviral HuCol7-pLZRS-Ires-Zeo	51
11. Diseño y construcción de nucleasas TALEN	51

12. Análisis de sitios de corte fuera de diana de la pareja de TALENs T6/T7	52
13. Construcción de vectores adenovirales para la expresión de TALENs.....	53
14. Producción y purificación de adenovirus recombinantes para la expresión de TALENs	53
15. Análisis de la actividad nucleasa: ensayo <i>Cel I</i> (<i>Surveyor</i>)	55
16. Experimentos de edición génica mediada por el mecanismo de NHEJ	55
16.1. Experimentos en la línea RDEB-E67A6	55
16.2. Experimentos en queratinocitos primarios de paciente	56
17. Experimentos de <i>targeting</i>	56
17.1. Construcción de vectores para la producción de AAV recombinantes portadores de las construcciones de <i>targeting</i>	56
17.2. Producción y purificación de vectores AAVs recombinantes	57
17.3. Transducción de queratinocitos de la línea RDEB-E67A6 con AAVr y Ad-TALENs.....	58
17.4. Genotipado de los clones resistentes a G-418 obtenidos por RH	58
17.4.1. Genotipado por PCR.....	58
17.4.2. Genotipado por Southern blot.....	59
17.5. Comprobación del transcrito de fusión <i>COL7A1/2A-neo</i>	60
17.6. Tratamiento de queratinocitos recombinantes con recombinasa Cre	60
18. Extracción de ARN y análisis de expresión por RT-PCR	60
19. Secuenciación automática	61
20. Western blot	61
21. Generación de equivalentes dermo-epidérmicos y trasplante a ratones inmunodeficientes	62
21.1. Preparación de equivalentes cutáneos.....	62
21.2. Trasplante a ratones inmunodeficientes	62
22. Procesamiento de los injertos cutáneos	63
23. Inmunofluorescencia e inmunohistoquímica.....	64
IV. RESULTADOS.....	67
1. ESTABLECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR INMORTALIZADA GENERADA A PARTIR DE QUERATINOCITOS DE PACIENTE EBDR.....	69
1.1. Inmortalización de queratinocitos primarios y derivación de la línea RDEB-E67A6	69
1.2. Caracterización de la línea celular inmortalizada RDEB-E67A6.....	70
1.2.1. Comprobación de la expresión de la proteína E7	70
1.2.2. Persistencia de la mutación c.6527insC del gen <i>COL7A1</i> de la línea RDEB-E67A6 ..	70
1.2.3. Análisis de la capacidad proliferativa y clonogenicidad <i>in vitro</i>	72
1.2.4. Análisis de la capacidad de diferenciación <i>in vitro</i>	73
1.2.5. Estudio citogenético	74
1.2.6. Evaluación del potencial tumorigénico.....	76
1.2.7. Potencial regenerativo y características fenotípicas <i>in vivo</i>	76
1.2.8. Comprobación de la preservación de la capacidad de síntesis de colágeno VII de la línea inmortalizada RDEB-E67A6 mediante transducción con un vector retroviral portador del ADNc del gen <i>COL7A1</i>	79

2. EDICIÓN GÉNICA PARA LA CORRECCIÓN EFICIENTE DE LA MUTACIÓN c.6527insC ALTAMENTE PREVALENTE EN LA POBLACIÓN ESPAÑOLA DE PACIENTES CON EBDR ...	80
2.1. Generación de nucleasas TALEN diseñadas para cortar en las proximidades de la mutación c.6527insC	80
2.2. Generación de vectores adenovirales para la expresión de nucleasas TALEN en queratinocitos	83
2.2.1. Caracterización de las preparaciones adenovirales	84
2.2.2. Análisis de posibles sitios de corte fuera de diana de la TALEN T6/T7	88
2.3. Corrección de la mutación c.6527insC por recombinación homóloga	90
2.3.1. Vectores de <i>targeting</i>	91
2.3.2. Experimentos de <i>gene targeting</i> : co-transducción de la línea RDEB-E67A6 con los vectores AAVr y los vectores adenovirales Ad-T6 y Ad-T7	92
2.3.3. Genotipado por PCR de los clones resistentes a G-418	92
2.3.4. Genotipado por Southern blot de clones resistentes a G-418	97
2.3.5. Escisión del casete de selección de los clones recombinantes mediante expresión transitoria de la recombinasa Cre mediada por un vector adenoviral	99
2.3.6. Análisis de expresión de los clones corregidos por RH	102
2.4. Edición del gen <i>COL7A1</i> mediante el mecanismo de reparación de extremos no homólogos (NHEJ)	105
2.4.1. Transducción de queratinocitos de la línea RDEB-E67A6 con los vectores adenovirales Ad-T6 y Ad-T7, obtención de clones y análisis de <i>indels</i>	105
2.4.2. Análisis de la expresión del ARNm de <i>COL7A1</i> en clones editados mediante el mecanismo de NHEJ	106
2.5. Recuperación de la expresión de colágeno VII en clones editados por RH y NHEJ	111
2.6. Análisis <i>in vivo</i> de la incorporación de colágeno VII a la unión dermo-epidérmica	113
3. CORRECCIÓN MEDIANTE EDICIÓN GÉNICA EN QUERATINOCITOS PRIMARIOS DE PACIENTE EBDR	115
3.1. Transducción de queratinocitos primarios EBDR con los vectores adenovirales AdT6/Ad-T7	115
3.1.1. Evaluación de la actividad nucleasa mediante el ensayo de CEL-1	116
3.1.2. Estimación del porcentaje de células con re-expresión de colágeno VII en la población policlonal de queratinocitos EBDR transducida con los vectores adenovirales Ad-T6 / Ad-T7	116
3.2. Aislamiento de clones a partir de la población policlonal transducida con los vectores Ad-T6 / Ad-T7 y genotipado por secuenciación	117
3.2.1. Análisis por Western blot de la expresión de colágeno VII en los clones EBDR editados	119
3.2.2. Restablecimiento de la expresión de colágeno VII y regeneración de epidermis a partir de la progenie de células madre epidérmicas EBDR editadas	119

V. DISCUSIÓN	123
VI. CONCLUSIONES	133
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	135
VIII. PUBLICACIONES	151

ABREVIATURAS

A

A ₂₆₀	Absorbancia a 260 nm
AAP	Proteína activadora del ensamblaje (<u>A</u> ssembly- <u>A</u> ctivating <u>P</u> rotein)
aa _s	<u>A</u> mino <u>á</u> cidos
AAVr	<u>AA</u> Vs <u>r</u> ecombinantes
AAVs	Virus adenoasociados (<u>A</u> deno- <u>A</u> ssociated <u>V</u> irus)
ABC	Complejo avidina-biotina (<u>A</u> vidin- <u>B</u> iotin <u>C</u> omplex)
Ad	<u>A</u> denovirus
ADN	<u>Á</u> cido <u>D</u> esoxirribo <u>N</u> ucleico
ADNc	<u>Á</u> cido <u>D</u> esoxirribo <u>N</u> ucleico <u>c</u> omplementario
AdV	Vectores adenovirales (<u>A</u> denoviral <u>V</u> ectors)
ARN	<u>Á</u> cido <u>R</u> ibo <u>N</u> ucleico
ARNg	<u>A</u> RN <u>g</u> uía
ARNm	<u>Á</u> cido <u>R</u> ibo <u>N</u> ucleico <u>m</u> ensajero

B

BAC	Cromosoma artificial bacteriano (<u>B</u> acterial <u>A</u> rtificial <u>C</u> hromosome)
BMZ	Zona de la membrana basal (<u>B</u> asement <u>M</u> embrane <u>Z</u> one)
BP	Penfigoide ampolloso (<u>B</u> ullous <u>P</u> emphigoid)
BSA	Seroalbúmina bovina (<u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumine)

C

Ca ²⁺	Iones de calcio
Cas9	Proteína asociada a CRISPR (<u>C</u> RISPR <u>A</u> ssociated <u>P</u> rotein)
CFE	Eficiencia de formación de colonias (<u>C</u> olony <u>F</u> orming <u>E</u> fficiency)
Chr	Cromosoma (<u>C</u> hromosome)
CME	<u>C</u> élulas <u>M</u> adre <u>E</u> pidérmicas
CMP	Proteína de matriz del cartílago (<u>C</u> artilage <u>M</u> atrix <u>P</u> rotein)
CMV	<u>C</u> itomegalovirus
ColVII	Colágeno tipo VII
Cre	Proteína Cre recombinasa
CRISPR	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (<u>C</u> lustered <u>R</u> egularly <u>I</u> nterspaced <u>S</u> hort <u>P</u> alindromic <u>R</u> epeats)

D

D	<u>D</u> ermis
DAB	3,3' <u>D</u> iaminobencidina
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol (4 (6 <u>D</u> i <u>A</u> midin-2- <u>P</u> henyl- <u>I</u> ndole))
DEJ	Unión dermoepidérmica (<u>D</u> ermo- <u>E</u> pidermal <u>J</u> unction)
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle's <u>M</u> edium)
DO	<u>D</u> ensidad <u>Ó</u> ptica
DSB	Rotura de doble cadena (<u>D</u> ouble <u>S</u> trand <u>B</u> reak)

E

E	<u>E</u> pidermis
EB	<u>E</u> pidermolisis <u>B</u> ullosa
EBD	<u>E</u> pidermolisis <u>B</u> ullosa <u>D</u> istrófica
EBDD	<u>E</u> pidermolisis <u>B</u> ullosa <u>D</u> istrófica <u>D</u> ominante
EBDR	<u>E</u> pidermolisis <u>B</u> ullosa <u>D</u> istrófica <u>R</u> ecesiva
EBDR sev-gen	<u>E</u> pidermolisis <u>B</u> ullosa <u>D</u> istrófica <u>R</u> ecesiva <u>se</u> vera <u>ge</u> neralizada
EBJ	<u>E</u> pidermolisis <u>B</u> ullosa <u>J</u> untural
EBS	<u>E</u> pidermolisis <u>B</u> ullosa <u>S</u> imple
EDTA	<u>E</u> tilén- <u>D</u> iamino- <u>T</u> etra- <u>A</u> cetato
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (<u>E</u> pidermal <u>G</u> rowth <u>F</u> actor)
Ex	<u>E</u> xón

F

FBS	Suero fetal bovino (<u>F</u> etal <u>B</u> ovine <u>S</u> erum)
Fib	<u>F</u> ibroblastos
FN	<u>F</u> ibro <u>n</u> ectina
FokI	Dominio FokI (del procariota <i>Flavobacterium okeanokoites</i>)
FP	<u>F</u> olículos <u>P</u> ilosos

G

GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (<u>G</u> lycer <u>A</u> ldehyde 3- <u>P</u> hosphate <u>D</u> e <u>H</u> ydrogenase)
GFP	Proteína verde fluorescente (<u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein)
GS	<u>G</u> lándulas <u>S</u> ebáceas
Gy	Gray

H

H&E	<u>H</u> ematoxilina/ <u>E</u> osina
HA	Hemaglutinina
HAdV-5	Adenovirus humano serotipo 5 (<u>H</u> uman <u>A</u> deno <u>V</u> irus serotype <u>5</u>)
HBS	Tampón HEPES salino (<u>H</u> EPES <u>B</u> uffered <u>S</u> aline)
HC	<u>H</u> eterocigoto <u>C</u> ompuesto
HDR	Reparación dirigida por homología (<u>H</u> omology- <u>D</u> irected <u>R</u> epair)
HEPES	Ácido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2'-Etanosulfónico
HK	Queratinocitos humanos (<u>H</u> uman <u>K</u> eratinocytes)
HM	<u>H</u> omocigoto
HPV	Virus del papiloma humano (<u>H</u> uman <u>P</u> apilloma <u>V</u> irus)
HT	<u>H</u> eterocigoto

I

<i>indel</i>	<u>i</u> nserción- <u>d</u> elección
iPS	Células madre pluripotentes inducidas (<u>I</u> nduced <u>P</u> luripotent <u>S</u> tem Cells)
IRES	Sitio interno de entrada al ribosoma (<u>I</u> nnner <u>R</u> ibosomal <u>E</u> ntry <u>S</u> ite)

ITRs	Repeticiones terminales invertidas (<i>Inverted Terminal Repeats</i>)
K	
K	Queratina (<i>Keratin</i>)
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
L	
LB	Medio de cultivo <i>Luria-Bertani</i>
LoxP	Sitio de reconocimiento de la recombinasa Cre
LTRs	Repeticiones terminales largas (<i>Long Terminal Repeats</i>)
LV	Vectores lentivirales (<i>Lentiviral Vectors</i>)
M	
MB	Membrana Basal
MEM	Medio Mínimo Esencial (<i>Minimum Essential Medium</i>)
MOI	Multiplicidad de infección (<i>Multiplicity Of Infection</i>)
MoMLV	Virus del sarcoma murino de Moloney (<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>)
MOPS	Tampón de 3-morfolino-1-propanosulfonato
MSCs	Células madre mesenquimales (<i>Mesenchymal Stem Cells</i>)
N	
NC	Dominio no colagenoso (<i>Non-Collagenous domain</i>)
NEO	Gen de resistencia a neomicina
NHEJ	Reparación por unión de extremos no homólogos (<i>Non Homologous End-Joining</i>)
NLS	Señal de localización nuclear (<i>Nuclear Localization Signal</i>)
nu/nu	Animales inmunodeficientes, portadores de una mutación que les confiere el aspecto de animales desnudos, sin pelo (<i>nude/nude</i>)
P	
p/v	Relación peso/volumen
pA	Secuencia o señal de poliadenilación
PAM	Motivo adyacente al protoespaciador (<i>Protospacer Adjacent Motif</i>)
pb	Par de bases
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PGK	Fosfoglicerato quinasa (<i>PhosphoGlycerate Kinase</i>)
PIF	Piel interfolicular
PPCs	Péptidos Penetrantes de Células
pRb	Proteína Retinoblastoma
PROGNOS	<i>Predicted Report Of Genomewide Off-targets Sites</i>
PV	Partículas Virales
Q	
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)

R

RFLP	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (<u>R</u> estriction <u>F</u> ragment <u>L</u> ength <u>P</u> olymorphism)
RH	<u>R</u> ecombinación <u>H</u> omóloga
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	PCR tras retrotranscripción del ARN
RV	Vectores retrovirales (<u>R</u> etroviral <u>V</u> ectors)
RVD	Diresiduo variable repetido (<u>R</u> epeat <u>V</u> ariable <u>D</u> iresidue)

S

SA	Sitio aceptor de splicing
SCC	Tampón salino de citrato sódico (<u>S</u> aline- <u>S</u> odium <u>C</u> itrate)
SDS	Dodecil sulfato sódico (<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulphate)
SIN	Autoinactivante (<u>S</u> elf- <u>I</u> nactivating)
SK	Síndrome de <u>K</u> indler
SKY	Cariotipo espectral multicolor (<u>S</u> pectral <u>K</u> aryotyping)
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido (<u>S</u> ingle <u>N</u> ucleotide <u>P</u> olymorphism)
SOE	<u>S</u> plicing by <u>O</u> verlap <u>E</u> xtension

T

TA	<u>T</u> ransitoriamente <u>A</u> mplificadoras
TALEN	Nucleasa TALE (<u>T</u> ranscription <u>A</u> ctivaror- <u>L</u> ike <u>E</u> ffector <u>N</u> ucleases)
TBE	<u>T</u> ris- <u>B</u> orato- <u>E</u> DTA
TBS	Solución salina tamponada con Tris (<u>T</u> ris <u>B</u> uffered <u>S</u> aline)
TCH	<u>T</u> rasplante de <u>C</u> élulas <u>H</u> ematopoyéticas
TE	<u>T</u> ris-HCl, <u>E</u> DTA

U

UPE	<u>U</u> nidad <u>P</u> roliferativa <u>E</u> pidérmica
UTR	Región no traducida (<u>U</u> n <u>T</u> raslated <u>R</u> egion)

V

V	Voltio
v/v	Relación <u>v</u> olumen/ <u>v</u> olumen
VP	Proteína viral de la cápside (<u>V</u> iral <u>P</u> rotein)

W

WT	Tipo silvestre (<u>W</u> ild <u>T</u> ype)
----	---

Z

ZEO	Gen de resistencia a zeocina
ZF	Dedos de Zinc (<u>Z</u> inc <u>F</u> inger)
ZFNs	Nucleasas de dedos de Zinc (<u>Z</u> inc <u>F</u> inger <u>N</u> ucleases)

RESUMEN

La Epidermolisis Bullosa Distrófica Recesiva (EBDR) es una grave enfermedad de fragilidad cutánea caracterizada por ampollas cutáneas generalizadas, deformidades de pies y manos y una alta predisposición al desarrollo de carcinomas epidermoides. No existe aún un tratamiento efectivo para esta enfermedad.

La forma más grave de todas las epidermolisis bullosas, la EBDR severa generalizada (EBDR sev-gen) se caracteriza por la ausencia total de colágeno tipo VII, componente principal de las fibrillas de anclaje que unen la epidermis a la dermis, debido a mutaciones nulas en *COL7A1*, el gen que codifica para este colágeno. Una mutación en el exón 80 de este gen (c.6527insC), que provoca la alteración de la pauta de lectura del ARN mensajero, se ha descrito en un alto porcentaje de los casos de EBDR estudiados en España (46%). La alta prevalencia de esta mutación justifica el desarrollo de una terapia personalizada para estos pacientes basada específicamente en la corrección clonal de esta mutación.

Los protocolos de terapia génica clonal basados en la manipulación precisa de células madre epidérmicas requieren el empleo de herramientas moleculares de edición génica altamente eficientes. En este trabajo, hemos combinado vectores adenoasociados (AAV) para la introducción de un ADN molde, con vectores adenovirales para la expresión de nucleasas TALEN con el objetivo de abordar la corrección de la mutación c.6527insC. Después de la transducción con ambos vectores virales, encontramos altas frecuencias de reparación dirigida por homología (HDR) en clones de queratinocitos inmortalizados derivados de un paciente EBDR homocigoto para la mutación c.6527insC. Los clones editados presentaron recuperación de la expresión del transcrito de *COL7A1* y de la correspondiente proteína a niveles fisiológicos.

Aunque la corrección de la mutación c.6527insC por recombinación homóloga es factible en queratinocitos de paciente inmortalizados, requiere el aislamiento y genotipado de clones resistentes al antibiótico de selección, una difícil tarea cuando se trabaja con células madre epidérmicas derivadas de paciente. En este trabajo, hemos demostrado que la reparación mediante el mecanismo de NHEJ de las roturas de doble cadena generadas por las TALENs resulta en la introducción de *indels* en una gran proporción de los clones de queratinocitos genotipados. Pequeñas deleciones en la secuencia del exón 80 originan transcritos que codifican cambios limitados en la secuencia aminoacídica y deleciones más grandes que implican la eliminación de las señales de *splicing* conducen a la síntesis de transcritos carentes de la secuencia correspondiente a los 12 aminoácidos del exón 80. Dada la factibilidad de esta estrategia para la corrección de la EBDR y teniendo en cuenta que la reparación por NHEJ ocurre con mucha más frecuencia que la corrección por recombinación homóloga, hemos abordado la edición de *COL7A1* en clones de células madre epidérmicas (holoclones). En este trabajo demostramos que la edición de este gen por NHEJ en clones individuales de células madre derivadas de paciente es posible. La corrección de este tipo celular ofrece la mejor opción para la generación de equivalentes de piel trasplantables con potencial terapéutico para los pacientes con EBDR.

Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa (RDEB) is a devastating skin fragility disease characterized by generalized skin blistering, mitten deformities and a high proneness to develop epidermoid carcinomas. To date, an effective treatment for RDEB remains unavailable.

The severe generalized RDEB (RDEB sev-gen) form is characterized by absence of type VII collagen, the main component of the anchoring fibrils connecting dermis and epidermis caused by null mutations in *COL7A1*, the gene that encodes this collagen. A recurrent frame-shift mutation in exon 80 of this gene, c.6527insC, has been described in a very high proportion (46%) of the Spanish RDEB population. The high prevalence of this mutation justifies the development of a targeted therapy based on clonal correction for these patients.

Clonal gene therapy protocols based on the precise manipulation of epidermal stem cells require highly efficient gene-editing molecular tools. In this work, we have combined adeno-associated virus (AAV)-mediated delivery of donor template DNA with transcription activator-like nucleases (TALE) expressed by adenoviral vectors to address the correction of the c.6527insC mutation. After transduction with these viral vectors, high frequencies of homology-directed repair were found in clones of immortalized keratinocytes derived from a RDEB patient homozygous for the c.6527insC mutation. Gene-edited clones recovered the expression of the *COL7A1* transcript and collagen VII protein at physiological levels.

Although correction of the c.6527insC mutation by homologous recombination in immortalized patient-derived keratinocytes is feasible, it requires obtaining and genotyping a large number of antibiotic-resistant keratinocyte clones, a difficult task when working with patient-derived epidermal stem cells. In this work we demonstrated that repair of the TALENs-generated DNA double strand breaks by the NHEJ mechanism results in the introduction of *indels* in a large proportion of keratinocyte clones. Small deletions within the exon 80 sequence resulted in transcripts encoding limited changes in aminoacid sequence and bigger deletions causing loss of intron processing signal resulted in truncated collagen transcripts lacking the sequence corresponding to the 12 aminoacids encoded by exon 80. Expression of collagen VII protein was detected in all clones with restored frames. Given the feasibility of this strategy for RDEB correction and considering that NHEJ-mediated repair occurs much more frequently than HDR, we also addressed the edition of *COL7A1* in epidermal stem cell derivatives or holoclones and demonstrated that the edition of this gene by NHEJ in single clones of patient-derived epidermal stem cells is possible. The correction of epidermal stem cells offers the best option for the generation of transplantable skin equivalents with therapeutic potential for RDEB patients.

I. INTRODUCCIÓN

1. LA PIEL

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano en cuanto a su peso y superficie. Representa aproximadamente el 10% del peso corporal y cubre un área de 1,5-2 m² en un adulto. Se trata de un órgano altamente especializado que actúa de barrera protectora entre el organismo y un medio ambiente exterior físico, químico y biológicamente muy agresivo. Posee funciones de termorregulación, inmunológicas, metabólicas, protege de la deshidratación y actúa como órgano sensorial.

1.1. Estructura de la piel humana

La piel se compone de dos tejidos principales y distinguibles en cuanto a su anatomía, función y desarrollo: la epidermis y la dermis. A su vez, estas capas están compuestas por distintos tipos celulares y presentan grandes diferencias en estructura y función:

La **dermis**, de origen mesodérmico, es una compleja estructura que actúa de soporte y mantenimiento de la epidermis. Está compuesta de dos capas: dermis papilar (tejido conectivo laxo conteniendo capilares, fibras elásticas, reticulares y algo de colágeno) y dermis reticular (formada por tejido conectivo denso, vasos sanguíneos, fibras elásticas estrechamente entrelazadas, haces gruesos de fibras de colágeno, terminaciones nerviosas y linfáticas y apéndices epidérmicos).

El tipo celular principal de la dermis es el fibroblasto, el cual se encarga de producir y secretar procolágeno y fibras elásticas. Mientras que el colágeno, principalmente de Tipo I (80-90%) y tipo III, representa el 75% del peso de la dermis, las fibras elásticas constituyen menos del 1% pero juegan un papel funcional al resistir las fuerzas de deformación y devolver la piel a su forma de reposo (Uitto, 2008).

La **epidermis**, capa más externa de la piel, es un epitelio escamoso estratificado en continua renovación, derivado del ectodermo y formado mayoritariamente por un tipo particular de células epiteliales: los queratinocitos.

Morfológicamente, en la epidermis se pueden diferenciar cuatro estratos: basal, espinoso, granuloso y córneo, representando cada uno de ellos diferente grado de diferenciación de los queratinocitos (Figura 1). Durante la homeostasis normal, los queratinocitos que se producen en el estrato basal migran hacia los estratos más superficiales durante el proceso de diferenciación epidérmica. El periodo de tiempo que tarda una célula desde que se origina hasta que, finalmente, se desprende de la superficie de la piel – proceso conocido como renovación epidérmica- es del orden de un mes y durante él, los queratinocitos experimentan profundos cambios morfológicos y bioquímicos asociados a cambios temporales y espaciales en la expresión génica. Así, los queratinocitos del estrato basal (proliferativo) permanecen adheridos a la membrana basal hasta que maduran y migran hacia la capa suprabasal (Fuchs, 1990; Kalinin *et al.*, 2002; Watt, 1989). Esta importante transición se caracteriza por la pérdida de contacto con la membrana basal, la pérdida de la capacidad de proliferar y la sustitución de la expresión de las queratinas K5 y K14 por las queratinas K1 y K10 (Fuchs y Green, 1980). Posteriormente, los queratinocitos suprabasales sufren un proceso asociado a la apoptosis, definido como diferenciación terminal, durante el cual las células

migran hacia los estratos superiores, se aplanan y especializan su actividad para, finalmente, dar lugar a una capa de células muertas queratinizadas, la capa córnea. El proceso de diferenciación terminal está asociado a la expresión de proteínas marcadoras como transglutaminasa, involucrina, filagrina y loricrina (Dale *et al.*, 1985; Mehrel *et al.*, 1990).

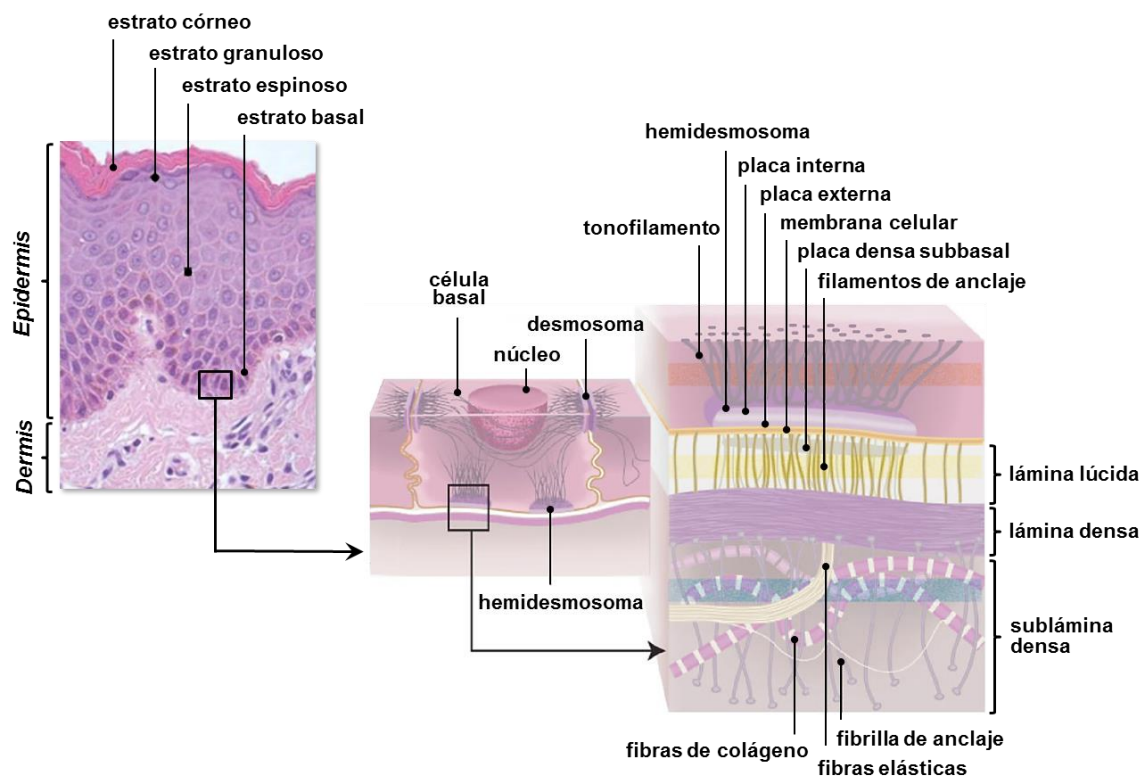


Figura 1. Micrografía de un corte histológico de piel humana teñido con hematoxilina-eosina (izquierda) donde se pueden observar los diferentes estratos que conforman la epidermis: estrato basal, espinoso, granuloso y córneo. Los queratinocitos basales se anclan a la lámina lúcida a través de hemidesmosomas (parte derecha de la figura).

La epidermis, al no contener vasos sanguíneos, depende enteramente de la dermis subyacente tanto para el aporte de nutrientes como para la eliminación de desechos vía difusión a través de la unión dermo-epidérmica.

1.2. Células Madre Epidérmicas (CME)

Las células madre epidérmicas son las responsables de la renovación, regeneración y reparación de la epidermis. Se localizan en los folículos pilosos (FP), en la capa basal de la epidermis interfollicular (PIF) y en la base de las glándulas sebáceas (GS). Se caracterizan por presentar una capacidad ilimitada de autorrenovación y pueden producir al menos un tipo de células adultas altamente diferenciadas. En condiciones de homeostasis normal, los FPs, la PIF y las GSs se mantienen a partir de sus propias células madre. Sin embargo, en determinadas circunstancias, cada una de las tres poblaciones de células madre es capaz de generar toda la epidermis. El porcentaje de células madre se estima entre el 5-10% (Fuchs, 2008; Fuchs y Horsley, 2008).

Existen diferentes teorías para explicar el mantenimiento de la homeostasis epidérmica. El modelo clásicamente aceptado propone que las células madre se dividen lentamente en el estrato basal para

dar lugar a las células progenitoras o transitoriamente amplificadoras (TA) las cuales amplifican el número de células para la reposición del tejido. Las células TA sólo tienen la capacidad de dividirse un número limitado de veces antes de migrar al estrato suprabasal y comenzar el proceso de diferenciación terminal. De acuerdo con este modelo, las células madre y su progenie estarían organizadas en una unidad proliferativa epidérmica (UPE), donde las células madre se encontrarían en el centro de la UPE, y las células más proliferativas (TA) se localizarían en la periferia (Potten, 1974). Sin embargo, ha sido propuesto recientemente un nuevo modelo de homeostasis según el cual un único tipo de célula progenitora se sometería a rondas ilimitadas de división para dar lugar a dos células terminalmente diferenciadas, dos células basales indiferenciadas o bien una de cada tipo (Clayton *et al.*, 2007). En este modelo existe un alto número de estas células en la capa basal y no requerirían un nicho específico, la membrana basal sería el nicho común a todas ellas. Hallazgos obtenidos en estudios recientes apoyan ambos modelos (Hsu *et al.*, 2014b; Lim *et al.*, 2013).

Mediante ensayos *in vitro* de formación de colonias (CFE, del inglés *Colony Forming Efficiency*) se ha demostrado que los queratinocitos epidérmicos constituyen una población heterogénea con respecto a su potencial clonogénico (Barrandon y Green, 1987; Green, 2008). Usando criterios morfológicos y en función de su potencial proliferativo, se diferencian tanto en queratinocitos en cultivo como recién aislados de la piel tres tipos clonales (Figura 2): (1) **Holoclonos**: colonias formadas principalmente por células madre que expresan altos niveles de integrina $\beta 1$, p63 y $\alpha 6$, y bajos niveles de CD71 (Suzuki y Senoo, 2012). Las colonias que se originan al reseñar un holoclón se caracterizan por ser de gran tamaño, redondas y presentar células de pequeño tamaño. La proporción de colonias abortivas supone menos del 5%. (2) **Meroclonos**: se cree que son células TA. Estas colonias están formadas por una mezcla de células con un potencial proliferativo muy variable. La cantidad de colonias abortivas que origina la progenie varía entre el 5% y el 95%. (3) **Paraclones**: células cuya progenie o bien no forma colonias o son exclusivamente abortivas. Estas células poseen un escaso potencial proliferativo y expresan altos niveles del marcador de diferenciación terminal, involucrina (Barrandon y Green, 1987).

Por tanto, un cultivo de queratinocitos humanos está compuesto por células con diferente capacidad de crecimiento y la mejor forma de identificarlas es mediante un experimento de análisis clonal. Estos estudios han permitido demostrar el extraordinario potencial proliferativo de los holoclonos (hasta 180 divisiones) (Mathor *et al.*, 1996). Sin embargo, estos clones procedentes de células madre epidérmicas son muy sensibles al estrés del cultivo *in vitro*. Así pues, los holoclonos mantienen la capacidad de autorenovación durante una serie de pases hasta que, progresivamente, se va restringiendo su capacidad proliferativa y su progenie se convierte en meroclonos y paraclones (Figura 2). El número de paraclones va aumentando con el número de pases hasta que, finalmente, la falta de células en división pone fin al cultivo. Este fenómeno es conocido como conversión clonal y depende fuertemente de la edad del donante y de las condiciones de cultivo (Pellegrini *et al.*, 1998). El mantenimiento de la capacidad proliferativa de las CME es un punto crítico en los procedimientos de terapia génica *ex vivo* y sólo puede lograrse reduciendo al mínimo el estrés celular durante la totalidad del proceso (Droz-Georget Lathion *et al.*, 2015).

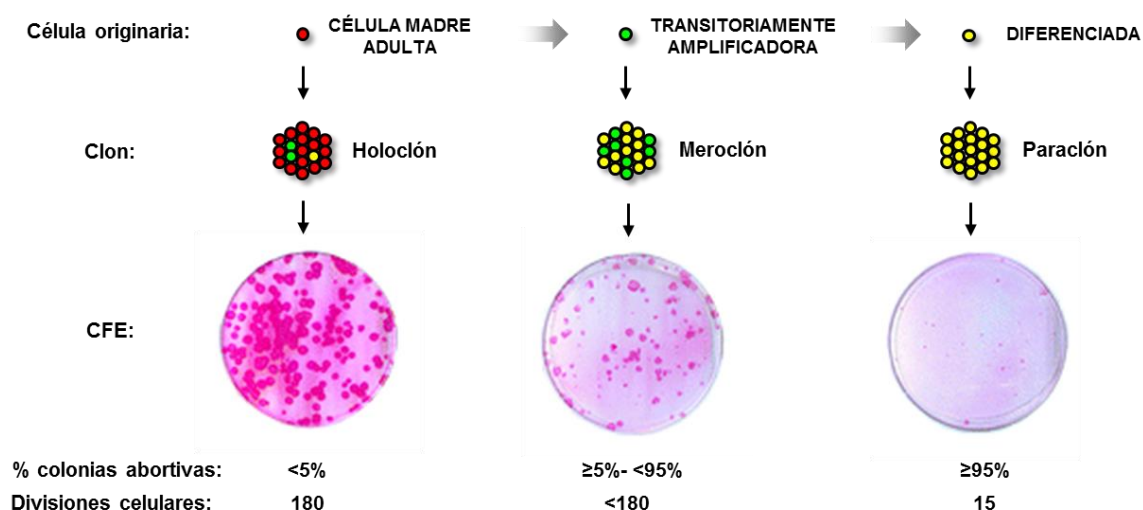


Figura 2. Esquema representativo de los tres tipos de células epidérmicas que se pueden definir por análisis clonal. Una única célula se aísla con una pipeta Pasteur y se siembra sobre una capa de *feeder*. En el caso de que la célula origine un clon, éste es pasado mientras todavía se encuentra en crecimiento exponencial. El número y la forma de las colonias que origine determinará el tipo clonal de la célula originaria. La progenie de un holoclón formará colonias grandes, redondas y en progresivo crecimiento; la progenie de un meroclón generará una mezcla de colonias grandes y colonias abortivas; y el paraclón dará lugar a colonias abortivas o bien no llega a formar colonias. Los ensayos clonogénicos se consideran los mejores predictores de las potenciales células madre epidérmicas interfoliculares. La transición de holoclón a meroclón, y de éste a paraclón se conoce como conversión clonal, es irreversible y está muy influenciado por las condiciones de cultivo. CFE, Ensayo de Formación de Colonias (del inglés, *Colony Forming Efficiency*).

1.3. La unión dermo-epidérmica

La unión dermoepidérmica (*DEJ*, del inglés *Dermo-Epidermal Junction*) es un importante sitio de unión en la piel localizado entre la capa basal de la epidermis y la dermis papilar. La DEJ permite la fijación física de la epidermis a la dermis y establece un vínculo fisiológico imprescindible para la correcta función de ambos tejidos (Kanitakis, 2002; Ko y Marinkovich, 2010).

La DEJ está formada por las membranas plasmáticas de las células situadas tanto por encima de ella (queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans) como por debajo (fibroblastos, mastocitos, etc.) y que se encuentran unidas a una compleja membrana común conocida como membrana basal. La DEJ junto con los complejos que la rodean forman la llamada Zona de la Membrana Basal (*BMZ*, del inglés *Basement Membrane Zone*). Esta zona contiene varios componentes únicos que forman estructuras auxiliares (complejos de anclaje) que sirven para reforzar la adhesión de las células epiteliales a la matriz extracelular de la dermis. Los complejos de anclaje incluyen los hemidesmosomas, los filamentos de anclaje y las fibrillas de anclaje (Bruckner-Tuderman, 1999; Van Agtmael y Bruckner-Tuderman, 2010).

Los **hemidesmosomas**, estructuras especializadas compuestas principalmente por plectina, BP230 (antígeno 1 del penfigoide ampolloso), integrina $\alpha 6 \beta 4$, colágeno XVII y tetraspanina/ CD151, unen los queratinocitos basales a la membrana basal. Estos complejos multiproteicos están formados por una placa interna conectada a los filamentos intermedios de queratina 5 y 14; una placa externa localizada en la cara citoplásmica de la membrana plasmática de los queratinocitos basales; y una fina y densa placa subbasal situada extracelularmente justo debajo de la membrana plasmática

(Tsuruta *et al.*, 2011). Por debajo de los hemidesmosomas, la lámina lúcida es atravesada por los llamados **filamentos de anclaje**, unas finas estructuras semejantes a hilos formados por diferentes isoformas de laminina (laminina-332, laminina-311, laminina-511) y la parte extracelular del colágeno XVII. La lámina densa, capa donde finalmente se anclan los filamentos de anclaje, está constituida principalmente por colágeno IV. Nidógeno y perlecano son otras glicoproteínas que forman parte de esta lámina (Breitkreutz *et al.*, 2009). Las **fibrillas de anclaje**, compuestas predominantemente por colágeno VII, se extienden desde la lámina densa hasta la dermis papilar subyacente asegurando la cohesión dermo-epidérmica (Sakai *et al.*, 1986; Van Agtmael y Bruckner-Tuderman, 2010) (Figura 3).

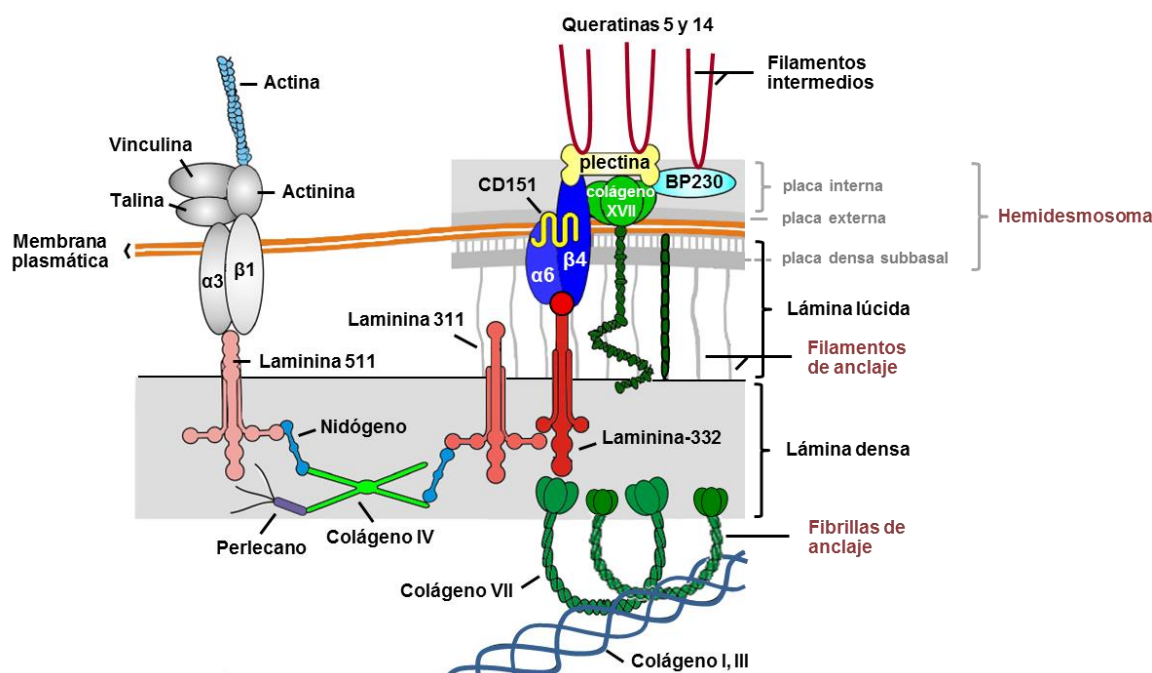


Figura 3. Representación esquemática de la Zona de la Membrana Basal (BMZ). Los hemidesmosomas junto con los filamentos de anclaje y las fibrillas de anclaje forman el llamado complejo de anclaje de cuya integridad depende la unión dermo-epidérmica. Los hemidesmosomas de los queratinocitos basales se conectan a los filamentos de anclaje los cuales atraviesan la lámina lúcida para conectar, a su vez, con las fibrillas de anclaje en la lámina densa. Las fibrillas de anclaje atrapan fibras de colágeno para reforzar la conexión entre el complejo de anclaje y la matriz extracelular de la dermis. Además de los hemidesmosomas, otro tipo de unión contribuye a la adhesión tejido epitelial-tejido conectivo: los contactos focales, que fijan los filamentos de actina del citoesqueleto a la membrana basal.

Dado que en esta tesis nos hemos centrado en el estudio del colágeno VII, esta molécula será explicada más a detalle a continuación.

1.4. Colágeno tipo VII

El colágeno tipo VII se clasifica dentro de la superfamilia de los colágenos (Chung y Uitto, 2010). Aunque es un colágeno minoritario en piel humana (representa menos del 0,001%) y muestra una localización espacial restringida, juega un papel crítico en la estabilidad integral de la piel debido a que es el principal componente de las fibrillas de anclaje (Bruckner-Tuderman *et al.*, 1987; Sakai *et al.*, 1986).

1.4.1. Biología del colágeno VII

El colágeno tipo VII es codificado por el gen *COL7A1* situado en el brazo corto del cromosoma 3 región 3p21.31 (Parente *et al.*, 1991; Ryyanen *et al.*, 1991). Este gen tiene un tamaño de 32 Kb, contiene 118 exones, y codifica para un ARN mensajero de 9,2 Kb que se traduce en el polipéptido pro α 1 (VII) de 2944 aminoácidos (Christiano *et al.*, 1994a; Parente *et al.*, 1991) (Figura 4). Cada cadena pro α 1 (VII) contiene un dominio colagenoso central de 145 KDa flanqueado por dos dominios no colagenosos denominados NC1 y NC2. A diferencia de otros colágenos fibrilares, el dominio colagenoso central, con repeticiones sucesivas Gly-X-Y necesarias para la formación de la triple hélice, se encuentra interrumpido 19 veces debido a inserciones y deleciones de aminoácidos (Christiano *et al.*, 1992). La interrupción más larga se corresponde con la denominada región “bisagra” (*hinge region*) que constituye un subdominio no colagenoso de 39 aminoácidos que confiere flexibilidad a la molécula y, según recientes estudios, podría jugar un importante papel como sitio de unión a otras proteínas (Richer y Seeger, 2014). El dominio amino-terminal NC1, de aproximadamente 145 KDa, está compuesto por varios submódulos que estructuralmente son similares a moléculas de adhesión conocidas incluyendo: un dominio con homología a la proteína de matriz del cartílago (CMP, del inglés *Cartilage Matrix Protein*), nueve dominios consecutivos de fibronectina tipo III (FN-III), un segmento con homología al dominio A del factor von Willebrand (vWF) y una región rica en prolina y cisteína. El dominio carboxi-terminal NC-2 es relativamente pequeño (30 kDa), y contiene un segmento con homología a la molécula inhibidora de la proteasa Kunitz (Christiano *et al.*, 1994b) (Figura 4).

El patrón de expresión del gen *COL7A1* es restringido y específico de tejido. Así, el colágeno VII ha sido detectado por inmunofluorescencia en un número limitado de epitelios, incluyendo en la zona de la unión dermoepidérmica de la piel, en epitelio corneal, mucosa oral, cérvix, esófago, colon, ano y corioamnios (Sakai *et al.*, 1986).

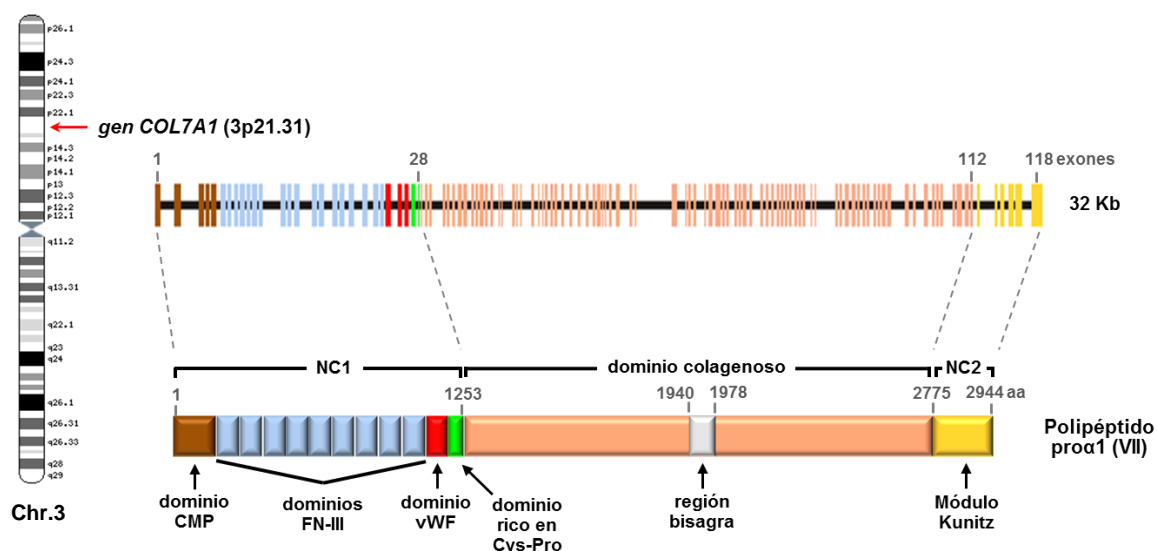


Figura 4. Estructura del gen *COL7A1* y del polipéptido pro α 1 (VII). El gen *COL7A1* tiene 118 exones (barras verticales) separados por intrones relativamente pequeños (líneas negras horizontales). Los exones codifican los diferentes dominios del polipéptido pro α 1 (VII): del exón 1 al 28, el dominio NC1; del exón 29 al 112, el dominio colagenoso central; y del exón 113 al 118, el dominio NC2. (aa: aminoácidos).

1.4.2. Biosíntesis de colágeno VII y formación de las fibrillas de anclaje

El colágeno VII es sintetizado y secretado a la matriz extracelular por los queratinocitos epidérmicos y los fibroblastos de la dermis como precursor, procolágeno VII (Ryynanen *et al.*, 1992). Tras la síntesis completa de polipéptidos pro α 1 (VII) por parte de estos dos tipos celulares, tres de estas cadenas se asocian a través de sus extremos carboxi-terminal para formar un homotrímero (procolágeno VII) cuyos dominios colagenosos se enrollan en una formación de triple hélice. Tras su secreción al espacio extracelular, los homotrímeros forman dímeros antiparalelos con los extremos carboxi-terminales solapados (Sakai *et al.*, 1986). El ensamblaje de los dímeros está acompañado por la rotura proteolítica de parte de los dominios NC-2 de ambas moléculas y la estabilización mediante la formación de puentes disulfuro intermoleculares (Colombo *et al.*, 2003). Finalmente, un gran número de dímeros antiparalelos se agregan lateralmente para formar las fibrillas de anclaje (Ryynanen *et al.*, 1992) (Figura 5).

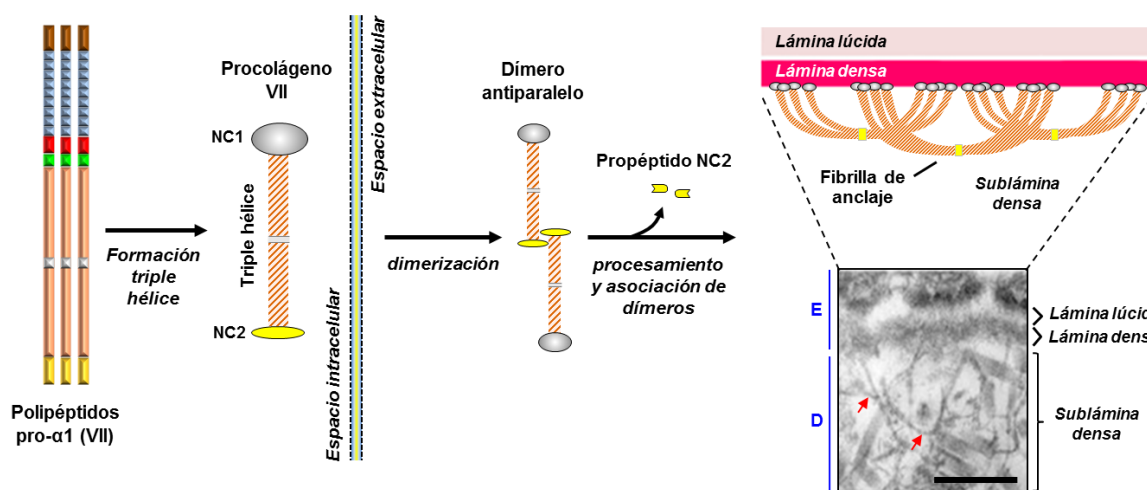


Figura 5. Representación esquemática de la polimerización de las fibrillas de anclaje. Tras la secreción al espacio extracelular de moléculas de procolágeno VII, éstas se asocian en dímeros antiparalelos que, una vez eliminado proteolíticamente una parte del extremo carboxi-terminal, se estabilizan. Posteriormente, varias moléculas de dímeros ensamblados se unen para formar las fibrillas de anclaje. En el análisis de microscopía electrónica de piel humana (Ortiz-Urda *et al.*, 2003) se muestran las fibrillas de anclaje (flechas rojas) conectando la lámina densa de la epidermis (E) a la dermis subyacente (D). Barra de escala= 500 nm.

2. GENODERMATOSIS: ENFERMEDADES DE LA PIEL DE ORIGEN GENÉTICO

Las genodermatosis constituyen un conjunto de afecciones de origen genético cuyas principales manifestaciones radican en la piel y sus anejos. Suponen un número muy importante de las patologías dermatológicas, aunque la mayoría son enfermedades que presentan una prevalencia muy baja y son consideradas enfermedades raras. Se han descrito más de 400 genodermatosis y, a pesar de que sus bases moleculares así como el mecanismo patogénico han sido dilucidados, no existe para la mayoría de ellas un tratamiento curativo.

Estas enfermedades hereditarias raras de la piel se agrupan en: a) Trastornos de la adhesividad epitelial, b) de la queratinización/ cornificación, c) de la pigmentación, d) de la reparación del ADN, e) del tejido conectivo, y f) displasias ectodérmicas (Larcher y Del Rio, 2015). En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de la Epidermolisis Bullosa (EB), un conjunto de genodermatosis que se encuadran en el primer grupo.

2.1. Epidermolisis Bullosa (EB)

Bajo la denominación de Epidermolisis Bullosa (EB), se encuentra un grupo de trastornos de baja prevalencia, genética y clínicamente heterogéneos, caracterizados por una extrema fragilidad de la piel y de las mucosas que da lugar a la formación de ampollas y erosiones en respuesta a una fricción menor o incluso sin ella (Fine *et al.*, 2008). Esta fragilidad se debe a mutaciones en genes que codifican para proteínas estructurales de la piel responsables de mantener la integridad y estabilidad mecánica del tegumento. Hasta el momento, se han documentado más de 1000 mutaciones en los 18 genes descritos como implicados en la patogenia de la EB (Fine *et al.*, 2014b) (ver los 18 genes en la Figura 6).

La EB abarca un amplio espectro de fenotipos que incluye desde manifestaciones cutáneas y extracutáneas graves causadas por una adhesión dermo-epidérmica muy comprometida hasta rasgos discretos causados por defectos moleculares sutiles (Larcher y Del Rio, 2015).

La prevalencia de esta enfermedad es de 8 a 25 casos por millón. Está considerada una enfermedad rara que afecta a personas de todos los orígenes étnicos y por igual a ambos géneros. Puesto que no existe actualmente una terapia efectiva es considerada, además, una enfermedad huérfana (El Hachem *et al.*, 2014).

La clasificación de la EB está sujeta a revisiones periódicas internacionales consensuadas, la última en 2013 (Fine *et al.*, 2014b). En esta última revisión se incluyen los nuevos fenotipos clínicos y mutaciones genéticas que han sido descritos desde el Informe de la Tercera Reunión Internacional sobre Diagnóstico y Clasificación de la EB en 2008 (Fine *et al.*, 2008).

De acuerdo a la última revisión, existen 4 tipos principales de EB que se agrupan, en función del nivel ultraestructural al que se forma la ampolla, en: **EB simple** (EBS), **EB Juntural** (EBJ), **EB Distrófica** (EBD) y **Síndrome de Kindler** (SK) (Figura 6). En la EBS la fragilidad se detecta a nivel intraepidérmico (pudiendo afectar tanto a los queratinocitos basales como suprabasales). En la EBJ la formación de ampollas se produce a nivel de la lámina lucida y en la EBD por debajo de la lámina

densa (a nivel de la dermis papilar). Mientras, en el SK la fractura puede ocurrir a cualquier nivel excepto en los estratos suprabasales (Fine y cols., 2014) (Figura 6).

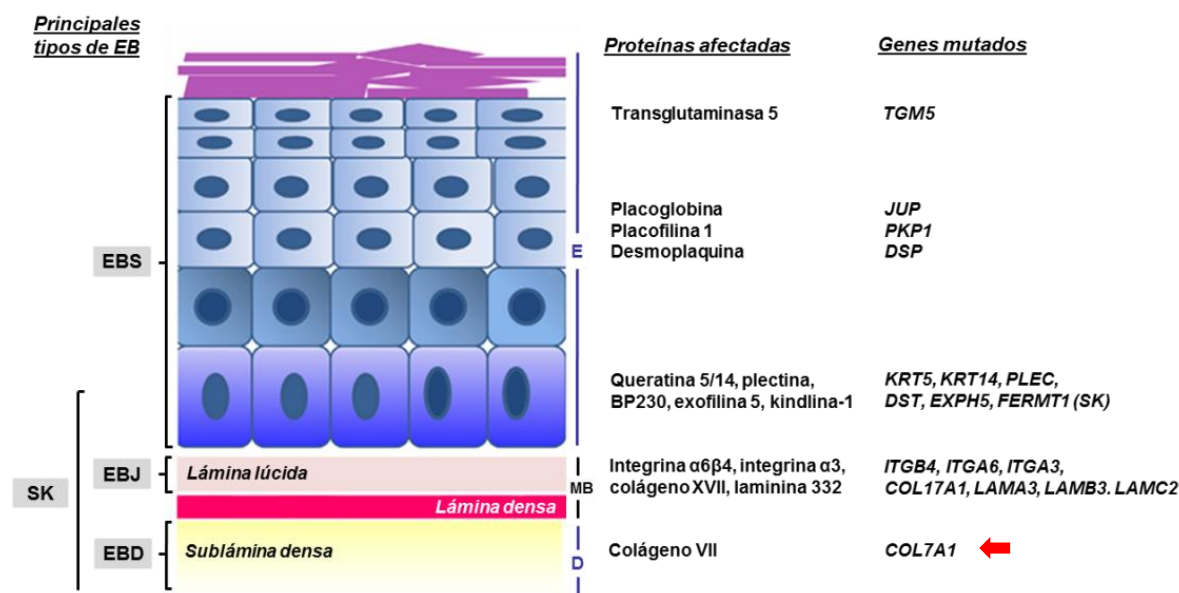


Figura 6. Representación esquemática de la epidermis (E), membrana basal (MB) y capa superior de la dermis (D), y localización de las proteínas específicas que se encuentran afectadas en los diferentes tipos de epidermolisis bullosa (EB) (en la columna de la derecha se indican los correspondientes genes mutados). Se han descrito mutaciones asociadas con EB en, al menos, 18 genes (en este trabajo nos hemos centrado en el gen *COL7A1*, flecha roja). En el esquema se representan los diferentes estratos de la epidermis: los queratinocitos del estrato basal, los queratinocitos de las capas suprabasales (estrato espinoso y granuloso) y el estrato córneo (color morado). Entre dermis y epidermis se localiza la membrana basal formada por la lámina lúcida y la lámina densa. A la izquierda, se indica el nivel al que se forman las ampollas en cada uno de los tipos de EB: intraepidérmica en la EBS (epidermolisis bullosa simple), intra-lámina lúcida en EBJ (epidermolisis bullosa juntural), o bien en la sublámina densa en EBD (epidermolisis bullosa distrófica). En el síndrome de Kindler (SK), la rotura puede ocurrir en el estrato basal, a nivel de la lámina lúcida o por debajo de la lámina densa.

Mutaciones en el colágeno tipo VII (codificado por el gen *COL7A1*) dan lugar a la EB distrófica, la forma más frecuente de las EB y en la que nos hemos centrado en este trabajo.

2.1.1. Epidermolisis Bullosa Distrófica (EBD)

Incluye las formas dérmicas de EB, en las que la separación tisular ocurre por debajo de la lámina densa, en la parte más superficial de la dermis. La EBD se subdivide en dos grandes grupos, dominante y recesiva, en función del tipo de herencia (Fine *et al.*, 2014b) (Tabla 1).

Dentro de las **EBD recesivas** se encuentra la forma más grave de todas las epidermolisis bullosas distróficas: la EBDR severa generalizada (**EBDR sev-gen**, OMIM #226600). Se trata del subtipo más frecuente de EBD y se caracteriza por una fragilidad cutánea extrema con la aparición de ampollas desde el nacimiento. Las lesiones bullosas se van extendiendo progresivamente por toda la superficie corporal y resultan en cicatrización atrófica. Estas lesiones son más intensas en los sitios de roce donde pueden ser hemorrágicas. La cicatrización exacerbadada a nivel de las extremidades motiva la

formación de contracturas y pseudosindactilia que, posteriormente, por continua sobreinfección puede llevar a la pérdida de falanges. La mucosa bucal en estos pacientes está muy afectada, dando lugar a microstomía y anquiloglosia severa que dificulta la ingesta de alimentos. Otras manifestaciones extracutáneas son las úlceras corneales, estenosis esofágica e insuficiencia renal crónica. Debido a las dificultades alimenticias y al enorme gasto proteico que presentan estos pacientes, aparecen intensas anemias ferropénicas que se traduce en un retraso del crecimiento (Bruckner-Tuderman, 2010). Todos estos rasgos clínicos se complican frecuentemente con el desarrollo de carcinomas epidermoides altamente invasivos y metastásicos en zonas con úlceras crónicas que reducen dramáticamente la esperanza de vida de los pacientes a la tercera-cuarta década de vida (Mellerio *et al.*, 2016).

Subtipo EBD	Nivel formación ampolla	Proteína afectada y nivel de expresión	Gen mutado
EBDD	Dermis (sublámina densa)	Colágeno VII: normal o reducido	COL7A1
EBDR, severa generalizada	Dermis (sublámina densa)	Colágeno VII: ausente o marcadamente reducido	COL7A1
EBDR, intermedia generalizada	Dermis (sublámina densa)	Colágeno VII: reducido	COL7A1
EBDR, localizada	Dermis (sublámina densa)	Colágeno VII: reducido o normal	COL7A1
EBDR, todos los demás subtipos	Dermis (sublámina densa)	Colágeno VII: reducido	COL7A1

Tabla 1. Clasificación de la EBD. Se indican los diferentes subtipos así como el nivel de expresión de colágeno VII que se observa por inmunofluorescencia. La EBD puede presentar un patrón de herencia dominante (EBDD) o recesivo (EBDR). Todas las formas de EBD se deben a mutaciones en el gen **COL7A1**. En la EBDR sev-gen (el subtipo más grave, sombreado en gris) el colágeno VII está marcadamente reducido o totalmente ausente. Los pacientes con este subtipo presentan ampollas y cicatrices generalizadas en piel y mucosas así como deformidades graves y una intensa afectación extracutánea.

2.1.1. La mutación c.6527insC del gen **COL7A1**

A pesar de la gran cantidad de mutaciones descritas a lo largo de toda la secuencia del gen **COL7A1** (680 mutaciones hasta la fecha, <http://www.hgmd.org/>, www.deb-central.org/), se ha identificado gracias a un estudio llevado a cabo por nuestro laboratorio (Escamez *et al.*, 2010), una mutación altamente frecuente en los pacientes diagnosticados de EBDR en población española. Esta mutación se encontró en el 46,3% de los alelos identificados en los pacientes participantes en el estudio. Se trata de la mutación patogénica c.6527insC situada en el exón 80 del gen **COL7A1**. Esta mutación altera la pauta de lectura del ARN mensajero y ocasiona la aparición de un codón de parada prematuro a la altura del exón 87. Cuando la mutación está presente en ambos alelos, la consecuencia es la ausencia total de colágeno VII en la unión dermo-epidérmica. Los pacientes homocigotos desarrollan el subtipo más agresivo de la enfermedad, la **EBDR sev-gen**.

Dada la elevada prevalencia de esta mutación en los pacientes españoles de EBDR, el desarrollo de una estrategia terapéutica específica y segura para su corrección sería clínicamente relevante.

3. APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS EN EBDR

El manejo clínico de la EBDR se ha centrado clásicamente en la aplicación y mejora de medidas paliativas encaminadas al cuidado de las heridas y al tratamiento del dolor (El Hachem *et al.*, 2014). Sin embargo, recientemente se han desarrollado terapias experimentales innovadoras con el objetivo de mejorar la clínica de la enfermedad mediante el aporte de colágeno VII funcional a los sitios específicos de localización de dicha proteína. Estas aproximaciones incluyen desde la liberación directamente de colágeno VII como proteína recombinante, hasta la introducción de células alogénicas de donante que sinteticen la proteína *in vivo*. Como se comentará a continuación, ambos enfoques han demostrado tener algunos beneficios, aunque no uniformes, tanto en modelos preclínicos como en estudios clínicos de fase I (Perdoni *et al.*, 2015). Sin embargo, la falta de una respuesta terapéutica completa ha impulsado el desarrollo de nuevas aproximaciones más efectivas así como la mejora de las ya existentes.

A continuación se describen las principales aproximaciones terapéuticas que se han desarrollado en EBDR en los últimos años, así como las limitaciones que presenta cada una de estas estrategias.

3.1. Terapia proteica

El uso de colágeno VII humano recombinante como posible tratamiento para los pacientes con EBDR fue sugerido por primera vez en 2004 con la demostración de la formación de fibrillas de anclaje funcionales en un modelo de piel EBDR murino y humano tras inyectar intradérmicamente la proteína recombinante (Woodley *et al.*, 2004a). Debido a la relativa larga vida media de la proteína, el colágeno VII permaneció en la unión dermo-epidérmica durante los tres meses de observación. Estos hallazgos llevaron a ampliar, años más tarde, el estudio en un modelo murino *Col7a1*^{-/-}, obteniéndose resultados similares (Remington *et al.*, 2009). Los anticuerpos desarrollados en estos ratones contra la proteína recombinante no impidieron la formación de las fibrillas de anclaje ni la mejora del fenotipo de la enfermedad.

Debido a la importante ventaja que supondría la administración sistémica de colágeno VII puesto que, teóricamente, proporcionaría proteína recombinante a todas las lesiones mucocutáneas del organismo, este mismo grupo procedió a la aplicación de infusiones intravenosas de colágeno VII en modelos de EBDR de ratón. La administración de colágeno VII por vía intravenosa es posible gracias a la sorprendente solubilidad que presenta esta proteína, a diferencia de otros colágenos, en tampones neutros y la sangre sin disparar la cascada de coagulación o agregación plaquetaria (Saelman *et al.*, 1994). Relevantemente, la proteína inyectada fue capaz de migrar hacia la zona de unión dermo-epidérmica y corregir el fenotipo ampollado (Woodley *et al.*, 2013).

Aunque los estudios preclínicos descritos en este apartado mantienen la aplicación traslacional y proporcionan una prueba de concepto para la terapia proteica, la necesidad de realizar inyecciones periódicas unido a la posibilidad de desarrollar anticuerpos anti-colágeno VII, son factores que pueden limitar la eficacia de esta aproximación (Bruckner-Tuderman, 2009).

3.2. Terapia celular alogénica

La terapia celular alogénica para EBDR consiste en la introducción en el paciente de células sanas derivadas de un donante, y por tanto capaces de producir colágeno VII, con el objetivo de mejorar la estabilidad de la unión dermo-epidérmica gracias a la contribución de las células donantes a la formación de las fibrillas de anclaje (Perdoni *et al.*, 2016).

Una de las opciones terapéuticas ha consistido en el empleo de **fibroblastos alogénicos**. Los fibroblastos, aunque son capaces de producir menos colágeno VII que los queratinocitos, se esperaba que fueran mejor tolerados por el sistema inmune del paciente. En un trabajo publicado en 2008, se describe que la aplicación en pacientes EBDR de inyecciones intradérmicas de fibroblastos alogénicos resulta en un aumento de colágeno VII en la unión dermo-epidérmica hasta un máximo de 3 meses. Desafortunadamente, las fibrillas de anclaje formadas no presentaban una morfología normal debido a la limitada cantidad de colágeno VII depositada antes del rechazo de las células del donante (Wong *et al.*, 2008). En un estudio posterior de 11 pacientes que recibieron, al igual que en el ensayo anterior, inyecciones intradérmicas localizadas de fibroblastos alogénicos, se observó una importante mejoría de la cicatrización de las heridas. Sin embargo, esta observación sólo se apreció en los primeros 28 días debido, de nuevo, a un rechazo inmunológico silente (Petrof *et al.*, 2013).

Una alternativa a los fibroblastos, han sido las **células madre mesenquimales** (MSCs). La capacidad de las MSCs de migrar a zonas de daño y facilitar la regeneración tisular constituyen dos factores esenciales de su potencial terapéutico. Desde el año 2010, se han sucedido varios estudios que demuestran los beneficios de utilizar estas células en terapia alogénica. Se ha comprobado en dos pacientes con EBDR que la administración intradérmica de MSCs de donante sano mejora la cicatrización de las heridas y restablece el depósito normal de colágeno VII en la unión dermo-epidérmica durante, al menos, 4 meses (Conget *et al.*, 2010). Estos hallazgos son realmente prometedores dadas las propiedades inmunomoduladoras de las MSCs (promueven la curación de heridas y reducen la fibrosis) (Alexeev *et al.*, 2011; Jacobs *et al.*, 2013; Nuschke, 2014; Qi *et al.*, 2014), sin embargo, debido a la corta vida que presentan las células alogénicas en el paciente, surge un problema muy similar al de la terapia proteica: es necesaria una administración periódica (Perdoni *et al.*, 2016).

Por otra parte, se ha demostrado que las **células progenitoras hematopoyéticas** son capaces de migrar a zonas del organismo lesionadas. Esto se ha comprobado, por ejemplo, en un modelo de infarto de miocardio (Abbott *et al.*, 2004; Leistner *et al.*, 2011). Para determinar si este procedimiento podría ser beneficioso en EBDR, se procedió a la realización de estudios preclínicos en ratones EBDR. Los ratones que fueron sometidos a un trasplante de células hematopoyéticas (TCH) presentaron una mayor tasa de supervivencia (Tolar *et al.*, 2009). Estos estudios sirvieron como prueba de concepto para el primer ensayo humano de fase I de TCH en pacientes con EBDR. Hasta la fecha, se han tratado más de 10 pacientes (ClinicalTrials.gov referencia NCT01033552) y, aunque ninguno de ellos se ha curado después de la realización del TCH, se ha documentado la mejoría de muchas de las características externas del fenotipo de la enfermedad lo que ha permitido una mejora su calidad de vida (Wagner *et al.*, 2010). Aunque los resultados parecen prometedores, el

régimen de acondicionamiento mieloablativo al que son sometidos los pacientes sumado a las numerosas complicaciones post-trasplante, convierten al TCH en un procedimiento de alto riesgo. De hecho, la muerte de dos pacientes debido a complicaciones del régimen mieloablativo, ha conducido necesariamente al reajuste de las condiciones del procedimiento. Incluso, se ha considerado si el empleo de MSCs mejorarían los resultados. No obstante, el trasplante de médula ósea y de sangre del cordón umbilical cuentan con dos ventajas muy importantes: primera, una vez implantadas las células madre del donante y superadas todas las complicaciones, la mejoría clínica sería, potencialmente, para la toda la vida lo que evitaría la necesidad de aplicar inyecciones repetidas; segunda, debido a que se trata de una terapia sistémica la mejoría incluiría, además de la piel, los epitelios internos. Sin embargo, el enorme desafío que supone realizar un TCH ha impulsado el desarrollo de otras estrategias basadas, fundamentalmente, en **terapias ex vivo personalizadas** (Perdoni *et al.*, 2014).

La capacidad que existe actualmente de poder modificar de manera específica una determinada secuencia de interés del genoma, permitiría corregir mutaciones del gen *COL7A1* causantes de la EBDR. La corrección de las propias células del paciente evitaría las complicaciones inmunológicas inherentes a las terapias alogénicas.

3.3. Terapia génica

Desde principios de la década del 2000, varios tipos de vectores de terapia génica (virales, no virales y basados en fagos), se han venido empleando en diversos estudios para conseguir la introducción del gen *COL7A1* o de su correspondiente ADNc en células derivadas de pacientes EBDR con el fin de restablecer la expresión de colágeno VII. Estas aproximaciones terapéuticas se encuadran dentro del marco de la **terapia génica clásica** puesto que el transgén incorporado permanece en un estado episomal o bien se integra aleatoria o semialeatoriamente en el genoma de las células diana (Goncalves, 2005).

A continuación se describen los estudios más relevantes realizados en EBDR empleando los vectores citados.

3.3.1. Vectores no virales.

El gran tamaño del gen *COL7A1* (32 Kb) y de su correspondiente ARNm (≈ 9 Kb) dificulta su introducción en las células diana mediante vectores virales. Debido a que las terapias basadas en plásmidos no tienen generalmente restricciones en cuanto a la capacidad de carga, se han utilizado para la transferencia del ADNc completo de *COL7A1* directamente en la epidermis de ratas a través de inyecciones locales (Sawamura *et al.*, 2002). Los resultados de este ensayo no resultaron prometedores ya que sólo una pequeña población de queratinocitos llegó a expresar colágeno VII y por tiempo limitado (1 semana). En otro trabajo de ese mismo año, la microinyección en queratinocitos inmortalizados EBDR de un cromosoma artificial derivado del fago P1 conteniendo el locus completo de 32 Kb de *COL7A1* junto con las secuencias genómicas adyacentes, resultó en la biosíntesis y secreción sostenida de procolágeno VII durante un año (Mecklenbeck *et al.*, 2002). Aunque este resultado evidenció que la restauración de la producción de colágeno VII es posible

mediante el empleo de estas construcciones genómicas de ADN, existe un problema importante: los cromosomas artificiales frecuentemente se integran en múltiples localizaciones cromosómicas. Este estudio puso de manifiesto la necesidad de desarrollar métodos de transferencia más eficientes y que permitieran un control más preciso de los eventos de integración (Perdoni *et al.*, 2015).

3.3.2. Transducción mediada por vectores virales

Los vectores virales han sido, históricamente, el método de elección en los estudios de terapia génica para EBDR. Los vectores **retrovirales** (RV) y **lentivirales** (LV) son capaces de integrarse en el genoma de la célula huésped y permitir la expresión estable y de larga duración del transgén.

En el año 2000, Chen *et al* usaron un vector RV con una versión truncada del gen *COL7A1*. Este “mini-gen”, que carecía de los exones del 70 al 104, se acomodaba al limitado tamaño de carga de los retrovirus. Los autores de este trabajo fueron capaces de transducir queratinocitos inmortalizados EBDR con el vector retroviral y conseguir la expresión de un producto de la proteína (mini-colágeno VII), que mejoraba el fenotipo celular EBDR por la normalización de la motilidad, adhesión celular y capacidad de proliferación (Chen *et al.*, 2000). En 2002, este mismo grupo usó un vector LV- autoinactivante (SIN) para la introducción de la secuencia completa del ADNc del gen *COL7A1* tanto en queratinocitos como fibroblastos derivados de un paciente con EBDR (Chen *et al.*, 2002). La eficiencia de transducción fue superior al 95% y la síntesis y secreción de colágeno VII persistió a lo largo de los 5 meses de observación *in vitro*. Las células corregidas fueron capaces de producir fibrillas de anclaje normales una vez trasplantadas en ratones inmunodeficientes. Un año más tarde, se publicó el empleo por primera vez de un vector RV para transducir la secuencia completa del ADNc de *COL7A1* en queratinocitos EBDR (Baldeschi *et al.*, 2003). Este grupo proporcionó también evidencias de que la corrección de células madre epidérmicas era posible. Este mismo año, Woodley *et al* usando un sistema LV similar al de Chen *et al*, corrigieron fibroblastos EBDR que, posteriormente, fueron inyectados intradérmicamente en un modelo de piel EBDR para asegurar el aporte de colágeno VII a la unión dermo-epidérmica (Woodley *et al.*, 2003). Posteriormente, también demostraron que las inyecciones intradérmicas directamente de un vector LV conteniendo el ADNc de *COL7A1* producían una expresión estable de colágeno VII en fibroblastos y células endoteliales en un modelo murino durante al menos 3 meses (Woodley *et al.*, 2004b).

Sin embargo, los RV y LV muestran una tendencia a integrarse en regiones del genoma transcripcionalmente activas (Wu *et al.*, 2003) lo que implica un importante riesgo de mutagénesis insercional. Estos efectos ya han sido documentados, por ejemplo, en ensayos previos de terapia génica en los cuales se ha relacionado directamente el empleo de vectores retrovirales con el desarrollo de leucemias (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2008; Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003).

Como alternativa a la transducción mediada por virus, se ha ensayado el empleo de vectores basados en integrasas de **fagos**. Estos vectores se han usado para la introducción del ADNc de *COL7A1* en células progenitoras epidérmicas derivadas de un paciente con EBDR (Ortiz-Urda *et al.*,

2002). Los autores de este trabajo usaron la integrasa del fago phiC31 la cual puede mediar la integración de grandes secuencias de ADN (hasta 10 Kb) siempre que contengan la secuencia específica de 285 pb denominada *attB*. Los autores vieron que la mayor parte de los clones analizados resultaron tener la integración de *COL7A1* en localizaciones predecibles basadas en los sitios ya conocidos pseudo-*attP*. Aunque también se encontraron integraciones aleatorias, ninguna de ellas se localizó en regiones codificantes. Con esta técnica se consiguieron eficiencias de transducción relativamente bajas con respecto a los métodos de transducción mediados por virus previamente descritos. Sin embargo, a través de la expansión y selección de las células productoras de colágeno VII, los autores lograron que más del 99% de las células sintetizaran proteína tras un periodo de selección de 10 días. El aporte persistente de colágeno VII durante 14 semanas apuntó a las células progenitoras epidérmicas como las principales responsables de la síntesis de proteína. Dos años más tarde, este mismo grupo publicó un estudio en el que, utilizando la misma integrasa del fago phiC31, corregían fibroblastos de paciente EBDR que posteriormente inyectaban en un modelo de piel EBDR (Ortiz-Urda *et al.*, 2003). La restauración de colágeno VII en la unión dermo-epidérmica fue evidente.

Sin embargo, la falta de regulación endógena de los transgenes y la posibilidad de mutagénesis insercional han constituido importantes factores limitantes a la hora de considerar la terapia génica mediada por proteínas de fagos como una opción mejor a la terapia mediada por vectores LV y RV.

Una alternativa a los vectores virales integrativos, son los **vectores virales no integrativos**. A este grupo pertenecen los vectores adenovirales (AdV) y adenoasociados (AAV). Estos vectores evitan, en gran medida, el riesgo de mutagénesis insercional debido a su naturaleza episomal. Sin embargo, el mantenimiento de estos vectores y la expresión del transgén en las células transducidas están limitados por la renovación celular (Thomas *et al.*, 2003).

Puesto que los adenovirus y AAVs no han sido empleados en este trabajo de tesis como vectores para la transferencia de un transgén que codifique para colágeno VII sino como vectores para la introducción de herramientas moleculares que permitan la edición del gen *COL7A1* en las células diana, serán tratados en el apartado 3.3.4.

Si bien la terapia génica clásica ha logrado con éxito la introducción de genes exógenos en el genoma, la imposibilidad de controlar el sitio de integración de los vectores virales ha supuesto una importante limitación. Para hacer frente a esta limitación fundamental de los métodos convencionales de adición génica, ha surgido con fuerza la tecnología de **edición génica** que permite realizar modificaciones precisas en secuencias concretas del genoma. A continuación se describirá esta tecnología en detalle.

3.3.3. Edición génica

Desde los primeros días de la terapia génica, se ha considerado a la edición génica como la estrategia perfecta para curar enfermedades genéticas. Esta estrategia nació de una idea conceptualmente muy simple en el caso de las enfermedades monogénicas: la terapia ideal es aquella que permita corregir directamente la mutación responsable de la enfermedad. Aunque actualmente las técnicas de edición permiten realizar modificaciones tan precisas como de un único nucleótido, los resultados obtenidos en los primeros estudios frenaron el desarrollo de esta estrategia. La baja frecuencia de corrección por recombinación homóloga (RH) que se conseguía en células somáticas (10^{-6}) impedía progresar en el desarrollo de una aproximación terapéutica eficaz (Sedivy y Dutriaux, 1999; Smithies *et al.*, 1985)

Sin embargo, el descubrimiento de que la introducción de cortes de doble hebra (DSBs, del inglés *double strands breaks*) en sitios específicos del ADN estimulaba el mecanismo de recombinación homóloga de 2 a 5 órdenes de magnitud, supuso un gran avance (Rouet *et al.*, 1994; Smih *et al.*, 1995). Las DSBs, además de aumentar la frecuencia de recombinación homóloga, también podían estimular hasta nueve órdenes de magnitud la generación de pequeñas inserciones y deleciones en el sitio específico de corte. Estos dos hallazgos convirtieron a las DSBs en el principio clave de la edición génica.

Por tanto, el proceso básico de la terapia génica por edición es la creación de DSBs específicas en sitios concretos del genoma y, a continuación, dejar que los propios mecanismos de reparación endógenos de la célula reparen la rotura. Las DSBs constituyen una de las mayores amenazas para la viabilidad celular por lo que las células eucariotas han desarrollado diferentes mecanismos para repararlas de forma eficiente. La célula puede reparar las roturas usando, principalmente, uno de estos dos mecanismos básicos: unión de extremos no homólogos (NHEJ, del inglés *Non-Homologous End Joining*) o recombinación homóloga (Wyman y Kanaar, 2006) (Figura 7a). Debido a la relevancia que presentan ambos mecanismos en la terapia génica por edición, se explicarán detalladamente a continuación:

- NHEJ.

Es un mecanismo eficiente y rápido de reparación de DSBs que consiste en la ligación, directamente, de los extremos generados tras la rotura. Esta vía no necesita la presencia de moléculas accesorias de ADN que actúen como molde y representa la ruta predominante de reparación en mamíferos, ocurriendo en una relación 1000:1 con respecto a la RH (Fattah *et al.*, 2008; Rodgers y McVey, 2016). Aunque la reparación de DSBs mediada por NHEJ puede ser bastante precisa, la reparación repetida de la misma DSB por la maquinaria de NHEJ resultará, eventualmente, en la formación de pequeñas mutaciones consistentes en inserciones o deleciones de nucleótidos (*indels*) en el punto de la rotura (Cox *et al.*, 2015). De hecho, se ha comprobado que las DSBs generadas por nucleasas se reparan de manera precisa (no mutagénica) en más del 70% de los casos. Si la nucleasa sigue activa, volverá a cortar en ese mismo sitio creando otra DSB. Este proceso iterativo de corte y reparación se detendrá cuando el sitio diana de la nucleasa, debido a los *indels* generados, no pueda ya volver a ser cortado.

Si se generan dos DSBs de manera simultánea en el mismo cromosoma, la maquinaria de NHEJ creará una delección entre los dos puntos de corte (Figura 7b). Con fines terapéuticos, esta estrategia permitiría incrementar la frecuencia de inactivación de elementos genéticos así como la eliminación de grandes regiones genómicas (Porteus, 2015).

- RH.

Esta ruta permite a los investigadores, mediante la introducción en las células diana de un ADN molde exógeno, especificar el resultado de la reparación de la DSB. Una vez generada la DSB, la maquinaria de recombinación homóloga puede usar el ADN molde de cadena simple o de doble cadena proporcionado exógenamente y que contiene secuencias de ADN homólogas a la secuencia diana, para sintetizar ADN que será usado para reparar la rotura. De esta manera quedarán incorporados los cambios especificados en el ADN donador (Figura 7a). Es fundamental que el ADN molde esté apropiadamente diseñado y que el método seguido para su introducción en la célula diana sea eficaz. Con esta estrategia es posible, por ejemplo, corregir una mutación concreta en un gen determinado para, de este modo, restaurar la función del gen mientras se preserva la regulación fisiológica de la expresión (Porteus, 2015).

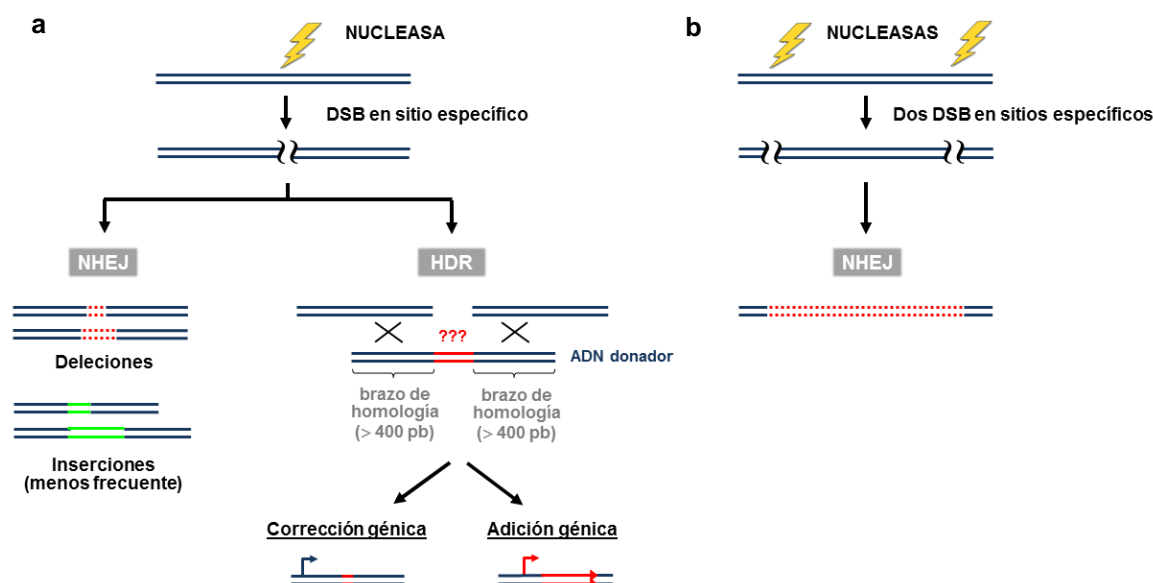


Figura 7. Las roturas de doble cadena (DSBs) generadas por las nucleasas de diseño en sitios concretos del genoma activan los mecanismos de reparación endógenos de la célula. Los dos mecanismos principales de reparación son el NHEJ y la RH. a) Cuando la reparación de una única DSB ocurre por la vía de NHEJ, se producen inserciones/delecciones en el punto de corte, siendo más frecuente la eliminación que la incorporación de nucleótidos. El tamaño de las delecciones suele ser mayor que el de las inserciones. Por el contrario, la reparación de la DSB por recombinación homóloga usando como molde una secuencia proporcionada exógenamente permite realizar cambios precisos en la secuencia diana. Estas modificaciones pueden implicar desde un nucleótido o un reducido número de nucleótidos (corrección mutación puntual), hasta la introducción de un transgén terapéutico en un locus preciso del genoma (adición génica). b) La edición de dos DSBs por NHEJ puede resultar en grandes delecciones, e incluso inversiones (100 veces menos frecuente que las delecciones).

La eficiencia del mecanismo de reparación por NHEJ y RH varía sustancialmente dependiendo del tipo celular y del estado del ciclo celular. En general, se considera que el mecanismo de NHEJ es más activo que la RH. Además, se cree que la vía de NHEJ está activa durante todo el ciclo celular y se ha observado en una importante variedad de tipos celulares, incluyendo células tanto en división como post-mitóticas (Rothkamm *et al.*, 2003). Por el contrario, la RH actúa principalmente durante la fase S/G₂ por lo que esta ruta está restringida, en gran medida, a células que se están dividiendo activamente lo que limita los tratamientos que requieren modificaciones génicas precisas a las células mitóticas (Chapman *et al.*, 2012).

Como se ha comentado anteriormente, la generación de DSBs constituye el elemento clave así como el primer paso de las estrategias basadas en edición génica. Por este motivo, el desarrollo de nucleasas capaces de introducir DSBs en sitios específicos del genoma ha permitido un enorme avance en la tecnología de la terapia génica por edición.

Durante varios años, las únicas nucleasas de diseño disponibles eran las nucleasas de dedos de Zinc (ZFNs, del inglés *Zinc Finger Nucleases*) (Porteus y Carroll, 2005; Urnov *et al.*, 2010) y las meganucleasas (Silva *et al.*, 2011). Sin embargo, en los últimos 6 años, el desarrollo de nucleasas TALEN (TALEN, del inglés *transcription activator-like effector nucleases*) (Bogdanove y Voytas, 2011; Christian *et al.*, 2010) así como de las endonucleasas de ADN dependiente de ARN Cas9 del sistema CRISPR (del inglés *clustered regularly interspaced short palindromic repeat*) (Cong *et al.*, 2013; Jinek *et al.*, 2012; Mali *et al.*, 2013) han expandido enormemente la caja de herramientas moleculares a disposición de los investigadores así como las posibilidades de edición génica. No obstante, todas ellas comparten el mismo mecanismo fundamental de acción: la generación de DSBs. Estas nucleasas de diseño se caracterizan por poseer un dominio de reconocimiento de ADN y otro dominio con capacidad de generar cortes en una secuencia definida del genoma. Estas herramientas moleculares son capaces de introducir de forma específica y en sitios concretos del genoma cortes de doble cadena en el ADN. Como hemos visto anteriormente, estas roturas darán lugar a diferentes modificaciones genéticas (interrupción de genes, corrección o adición génica) dependiendo del mecanismo utilizado para la reparación.

A continuación se describen las características de los tres tipos de endonucleasas más utilizadas actualmente en ingeniería genética. Debido a que las nucleasas TALENs han sido la herramienta utilizada en este trabajo, se explicarán más detalladamente.

- **ZFNs.** Son proteínas artificiales constituidas por varios dominios de dedos de zinc fusionados al dominio nucleasa de la enzima de restricción de tipo IIS, FokI. Los dominios están compuestos por un conjunto de 3 a 6 dedos de zinc que tienen como función la unión específica al ADN, mientras el dominio endonucleasa posee actividad enzimática y mediará la ruptura de la doble cadena de ADN (Kim *et al.*, 1996).

El dominio de dedos de zinc Cys2-His2 es el motivo de unión al ADN más común y consiste en unos 30 aminoácidos en configuración $\beta\beta\alpha$ formando una estructura en forma de *loop* o dedo que se mantiene unida gracias a la interacción de dos residuos cisteína y dos residuos histidina con un

átomo central de Zinc. Estos motivos, que se derivan del dominio de dedos de zinc Zif268, son diseñados para el reconocimiento de secuencias concretas del genoma mediante el empleo de metodologías de alta complejidad y de intenso trabajo (Maeder *et al.*, 2008).

Como el dominio nucleasa FokI necesita dimerizar para ser funcional, es preciso construir una pareja de ZFNs que al reconocer el ADN queden posicionadas en estrecha proximidad (espaciador de 5-7 pb) y en orientaciones inversas (Smith *et al.*, 2000) (Figura 8).

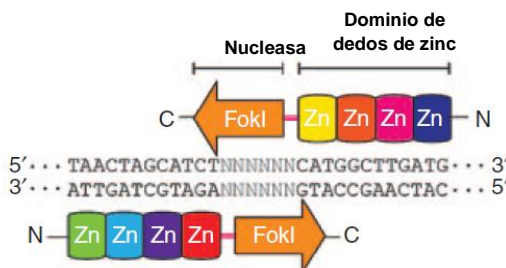


Figura 8. Diagrama de una pareja de ZFNs. Las ZFNs están basadas en motivos de dedos de zinc artificiales en los cuales dos residuos de cisteína de las láminas β y dos residuos de histidina de la α -hélice están tetraédricamente coordinados por un ión de zinc. Cada motivo de dedo de zinc contacta con 3 pb de ADN.

El tamaño relativamente pequeño de las nucleasas ZFNs permite el empleo de diversos tipos de vector para su expresión en las células diana. Sin embargo, la complejidad de su construcción así como la falta de especificidad de algunos dominios ZF que pueden dar lugar a reconocimientos erróneos de bases con la consecuente posibilidad de generación de cortes fuera de diana, son dos factores limitantes que restringen su uso generalizado (Gabriel *et al.*, 2011; Pattanayak *et al.*, 2011).

No obstante, desde que los primeros experimentos con ZFNs demostraron que las DSBs generadas por estas nucleasas podían ser usadas para modificar el genoma a través de cualquiera de las dos vías de reparación (NHEJ o RH), numerosos trabajos en los que se emplea esta tecnología se han ido sucediendo, de hecho, se ha publicado la modificación con éxito de genes tanto de células somáticas (Maeder *et al.*, 2008; Moehle *et al.*, 2007; Urnov *et al.*, 2005) como de células madres pluripotentes (Hockemeyer *et al.*, 2009; Lombardo *et al.*, 2007; Sebastiano *et al.*, 2011; Soldner *et al.*, 2011; Zou *et al.*, 2009).

- **TALENs.** Las nucleasas TALENs presentan una estructura similar a las ZFNs: un dominio de reconocimiento de ADN fusionado por su extremo carboxiterminal al dominio con actividad nucleasa FokI. Sin embargo, estas nucleasas presentan una clase diferente de dominios de unión al ADN conocidos como TALEs (del inglés, *transcription activator-like effectors*) los cuales derivan de la bacteria patógena de plantas *Xanthomonas* spp. Proteínas TALEs derivadas de la bacteria *Ralstonia* spp., otra bacteria fitopatógena, también pueden ser diseñadas para su unión a secuencias de ADN predeterminadas (Li *et al.*, 2013).

El dominio TALE está compuesto por una serie de repeticiones en tándem, cada una de ellas, de 33 a 35 aminoácidos. Cada repetición reconoce un único par de bases del ADN (Deng *et al.*, 2012; Mak *et al.*, 2012). La especificidad de nucleótido de cada repetición está determinada por

dos aminoácidos altamente variables situados en las posiciones 12 y 13 (RVDs, del inglés *repeat variable diresidues*) (Boch *et al.*, 2009). El aminoácido de la posición 13 contacta con su correspondiente base en el surco mayor del ADN, mientras que el aminoácido de la posición 12 participa en la estabilización de las unidades de repetición (Deng *et al.*, 2012). Además del dominio central que media la interacción con su correspondiente secuencia nucleotídica, las TALEs naturales están compuestas por dos dominios adicionales. El dominio N-terminal de traslocación responsable de la preferencia de una timina (llamada T₀) como primera base en la secuencia diana, y el dominio C-terminal que contiene las señales de localización nuclear (NLS, del inglés *nuclear localization signal*) así como el dominio de activación transcripcional (Figura 9) (Richter *et al.*, 2016).

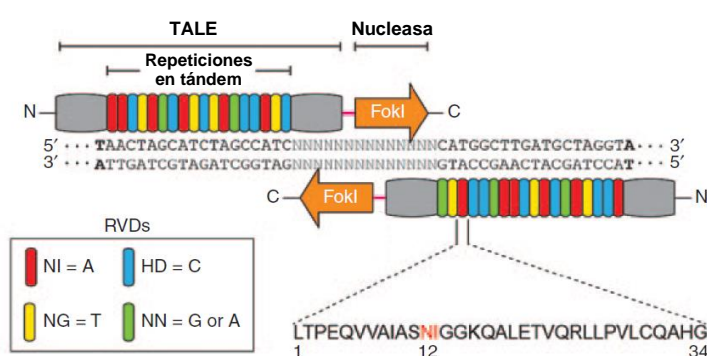


Figura 9. Una nucleasa TALE típica está formada por un dominio de traslocación N-terminal, un dominio central compuesto por las repeticiones en tándem que permiten el reconocimiento de secuencias específicas de ADN y la región C-terminal que incluye una señal de localización nuclear y un dominio de activación transcripcional. El dominio TALE de unión al ADN se fusiona al dominio catalítico de la endonucleasa de FokI para generar la TALEN. El reconocimiento de la secuencia diana obedece a una sencilla correspondencia uno a uno existente entre RVD y nucleótido (Asn-Asn (NN) reconoce guanina, Asn-Ile (NI) reconoce adenina, His-Asp (HD) reconoce citosina y Asn-Gly (NG) reconoce timina).

Mediante el análisis de secuencias de TALEs conocidas y su correspondiente diana en los promotores de genes de arroz, dos grupos identificaron el código que rige el emparejamiento preferencial de los RVDs con las bases del ADN (Boch *et al.*, 2009; Moscou y Bogdanove, 2009). Desde la dilucidación en 2009 de este sencillo código de asociación RVD- nucleótido (ver correspondencia en la Figura 9), la utilización de las TALENs como herramienta molecular en ingeniería genética se ha desarrollado enormemente.

La correspondencia entre los cuatro RVDs y las cuatro bases del ADN permite diseñar fácilmente nuevos TALENs con la especificidad de secuencia deseada. Además de emplearse unidades de repetición con RVDs naturales, actualmente se están diseñando nuevos RVDs que están siendo ya utilizados para la construcción de TALENs. Estos RVDs de diseño parecen ser más específicos que los naturales (Miller *et al.*, 2015). No obstante, es importante destacar que incluso las TALENs que contienen repeticiones con RVDs naturales parecen ser más específicas que las ZFNs (Porteus, 2015).

Al igual que las ZFNs, como el dominio de unión al ADN está fusionado al dominio catalítico de la endonucleasa FokI, es necesario generar dos construcciones que se sitúen sobre la diana en la orientación correcta y a una distancia adecuada para permitir la dimerización de FokI (Mussolino *et al.*, 2014). También similar a las ZFNs, las TALENs han demostrado inducir tanto la vía de NHEJ como de RH mediante la introducción de manera eficiente de DSBs en la secuencia diana. Esto se ha comprobado en células somáticas (Miller *et al.*, 2011; Mussolino *et al.*, 2011) y en células madre pluripotentes (Ding *et al.*, 2013; Hockemeyer *et al.*, 2011). A pesar de estas similitudes, la construcción de TALENs es mucho más simple que la construcción de ZFNs puesto que simplemente es necesario utilizar el código de correspondencia para determinar las repeticiones necesarias para el reconocimiento de una determinada secuencia diana (Porteus, 2015). Además, actualmente existen varias plataformas que permiten la rápida construcción de TALEs. Los métodos más simples utilizan técnicas de clonación estándar para ensamblar los distintos módulos repetidos del dominio central a partir de una colección de plásmidos (cada plásmido contiene una única repetición). Dentro de este método se encuentra el clonado molecular mediante la técnica Golden Gate la cual permite ensamblar múltiples fragmentos de ADN de forma ordenada en una sola reacción (Cermak *et al.*, 2011). Los métodos de más alto rendimiento incluyen el ensamblaje mediante ligación rápida en fase sólida (Reyon *et al.*, 2012) y el ensamblaje mediante técnicas de clonación independientes de ligación (Schmid-Burgk *et al.*, 2013).

Las TALENs pueden ser diseñadas, virtualmente, frente a cualquier secuencia del genoma dada que su única restricción es el requerimiento de una timina en 5' (T₀), dictaminada por el dominio N-terminal. Esta ilimitada posibilidad de diseño sumado a su relativa facilidad de construcción han convertido a las TALENs en una atractiva herramienta molecular de edición génica (Porteus, 2015).

- **Nucleasas CRISPR/Cas9.** El sistema CRISPR/Cas9 ha surgido recientemente como una nueva herramienta para introducir eficientemente modificaciones en el genoma (Cong *et al.*, 2013; Cho *et al.*, 2013; Jinek *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013). De forma natural, el sistema CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas, del inglés *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)/ Cas (proteína asociada a CRISPR, del inglés *CRISPR associated protein*), constituye un sistema inmune adaptativo en procariotas implicado en la defensa frente a la invasión de plásmidos y virus (Doudna y Charpentier, 2014; Hsu *et al.*, 2014a).

Este sistema como herramienta de edición génica consta de dos componentes clave: una endonucleasa no específica (Cas9) y una secuencia corta de ARN (ARNg) que se asocia con Cas9 y actúa como guía para que la endonucleasa se una a una secuencia específica del genoma donde ejercerá su acción. La proteína Cas9 presenta dos dominios con actividad nucleasa, un dominio próximo al extremo aminoterminal de tipo RuvC que corta la cadena 5' → 3', y un dominio HNH situado en mitad de la proteína y que corta la cadena 3' → 5' (Cong *et al.*, 2013) (Figura 10).

El sistema CRISPR-Cas media la escisión específica de sitio a través del emparejamiento de bases de Cas9-ARNg a una secuencia diana próxima al motivo adyacente al protoespaciador (PAM, del inglés *protospacer adjacent motif*) la cuál es esencial para la especificidad de unión de

Cas9. La secuencia PAM difiere entre los diferentes sistemas CRISPR-Cas. En el caso del sistema derivado de *Streptococcus pyogenes*, uno de los más utilizados, este motivo es 5'-NGG-3' (Anders *et al.*, 2014).

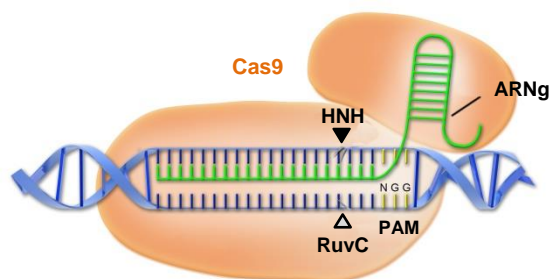


Figura 10. Esquema del sistema CRISPR/Cas9. El complejo Cas9- ARNg se une a la secuencia genómica diana donde media un corte específico en el ADN. La única limitación de secuencia de este sistema deriva de la necesidad de un motivo (PAM) localizado inmediatamente en 3' de la secuencia diana.

Las nucleasas CRISPR/Cas9 no requieren, a diferencia de las ZFNs o las TALENs, la construcción de nuevas proteínas para cada sitio diana. La relativa facilidad con la que nuevos sitios pueden ser diana, simplemente modificando la secuencia del ARNg, convierte a este sistema en un método muy atractivo para la introducción de DSBs en sitios específicos del genoma (Maeder y Gersbach, 2016).

Si bien los tres tipos de nucleasas genómicas descritas son capaces de introducir eficientemente DSBs en la secuencia genómica deseada pueden potencialmente actuar sobre localizaciones fuera de diana y por tanto introducir alteraciones no deseadas. El análisis de estas modificaciones es técnicamente complejo y se han desarrollado diversas herramientas para este fin (Hendel *et al.*, 2015). Es posible llevar a cabo predicciones de posibles lugares de actividad mediante herramientas bioinformáticas en base a la similitud con la secuencia diana, para posteriormente analizar la presencia de alteraciones exclusivamente en estas localizaciones. Otras aproximaciones permiten un análisis genómico no sesgado basado en la integración de secuencias marcadoras en roturas del ADN en doble cadena y la posterior identificación de los lugares de integración mediante secuenciación masiva (Gabriel *et al.*, 2011; Lin y Waldman, 2001; Miller *et al.*, 2004). Otras herramientas desarrolladas recientemente que permiten un análisis no sesgado incluyen *Guide-seq* (Tsai *et al.*, 2015), *HTGTS* (Frock *et al.*, 2015), *BLESS* (Ran *et al.*, 2015) y *Digenome-seq* (Kim *et al.*, 2015). El análisis de los sitios de corte fuera de diana de las nucleasas, junto con determinación del cariotipo y estudios de potencial carcinogénico mediante trasplante de clones celulares corregidos en ratones inmunodeficientes, permiten llevar a cabo estimaciones de bioseguridad en protocolos de terapia génica clonal *ex vivo*.

Por otra parte, el éxito de las estrategias de edición génica no sólo depende de la construcción de nucleasas que sean capaces de generar de manera eficiente y precisa DSBs en una secuencia concreta del genoma, sino también de la introducción eficaz de dichas nucleasas de diseño en las

células diana, lo cual puede realizarse *ex vivo* mediante la modificación y el posterior trasplante autólogo de las células corregidas, o *in vivo* mediante la expresión directa de las nucleasas en el tejido afectado. Ambas estrategias se tratarán brevemente a continuación y se resaltarán las ventajas y desventajas más relevantes.

La **edición génica *ex vivo*** se basa en la capacidad para aislar células diana del tejido afectado, modificarlas *in vitro* mediante la acción de nucleasas y trasplantarlas de nuevo al paciente para generar un injerto estable en el mismo. Este modo de terapia permite, en primer lugar, aplicar un amplio rango de técnicas (electroporación, lípidos catiónicos, péptidos penetrantes de células (PPCs), nanotubos de carbono, vectores virales, etc.) para la introducción de forma eficaz de las herramientas moleculares en la población celular diana lo que permite alcanzar altas tasas de edición gracias al amplio desarrollo de estos sistemas (Cox *et al.*, 2015). En segundo lugar, generalmente es posible controlar la dosis de moléculas terapéuticas transferidas a las células. Limitar la cantidad de nucleasas podría, en teoría, reducir la generación de modificaciones inespecíficas (Hsu *et al.*, 2013). En tercer lugar, debido a que no se expone al paciente directamente a los vectores y nucleasas, los protocolos son más seguros. Las células diana pueden ser seleccionadas, expandidas y analizadas rigurosamente según criterios de bioseguridad antes de ser implantadas de nuevo en el paciente (Kay, 2011).

Sin embargo, la edición *ex vivo* tiene dos grandes inconvenientes. En primer lugar, las células diana deben ser capaces de sobrevivir a toda la manipulación a la que van a ser sometidas fuera del organismo. Este requisito imprescindible supone un complicado reto en el caso de muchos tejidos cuyas células, una vez aisladas del paciente, o mueren o pierden propiedades fundamentales para su función *in vivo*. Por este motivo, la terapia *ex vivo* está limitada en gran medida a tejidos con poblaciones de células madre adultas susceptibles de ser cultivadas y manipuladas *in vitro* como es el caso del sistema hematopoyético y la epidermis. En segundo lugar, las células a menudo injertan mal una vez reintroducidas en el paciente lo que disminuye la efectividad de la estrategia terapéutica (Cox *et al.*, 2015).

En la **edición génica *in vivo*** las nucleasas son introducidas directamente a las células diana en sus tejidos nativos. Este enfoque presenta, principalmente, dos ventajas con respecto a la terapia *ex vivo*. En primer lugar, se puede aplicar a enfermedades en las cuales el tipo celular afectado no es susceptible de ser manipulado *ex vivo* y, en segundo lugar, las herramientas para la edición pueden expresarse simultáneamente en varios tejidos si se emplea el vector adecuado, lo cual permitiría tratar enfermedades que afectan a múltiples órganos. El desarrollo de vectores virales con tropismo específico de tejido es esencial en la terapia *in vivo* (Kotterman y Schaffer, 2014).

Sin embargo, una importante limitación es la potencial respuesta inmunitaria que se puede desencadenar ante la presencia de la gran cantidad de virus que se necesita para el tratamiento (Mingozi y High, 2013; Tse *et al.*, 2015). Este fenómeno no es exclusivo de la edición génica *in vivo* puesto que se ha observado en otras terapias basadas en virus (Bessis *et al.*, 2004). Además, la dificultad para controlar la distribución y por tanto la dosis de nucleasas, así como la imposibilidad de hacer una estimación de bioseguridad de la población celular corregida, pueden conducir a mutaciones inespecíficas fuera de diana con efectos difíciles de predecir.

3.3.4. Vectores virales para la introducción de herramientas moleculares de edición génica

Las continuas modificaciones que se realizan en los vectores virales para adaptarlos a las estrategias actuales de edición génica están fundamentadas, en gran parte, en el conocimiento adquirido durante el desarrollo de estos vectores cuando eran empleados en protocolos de terapia génica clásica (Kay *et al.*, 2001; Maggio y Goncalves, 2015).

Hoy en día, los vectores virales han sido desarrollados no sólo para introducir de manera eficaz nucleasas de diseño en las células diana, sino también secuencias de ADN que actúen como molde para la corrección basada en recombinación homóloga. En algunos casos, los protocolos de transducción en ciertas estrategias de edición génica implican el empleo simultáneo de diferentes tipos de vectores virales (Chen y Goncalves, 2016).

En este apartado nos centraremos únicamente en los vectores adenovirales (AdV) y adenoasociados (AAV) puesto que han sido los dos tipos de vectores empleados en este trabajo de tesis doctoral.

- Vectores adenovirales

Los AdVs presentan una serie de características que los convierten en una opción muy interesante para introducir en las células diana tanto nucleasas como ADN molde en protocolos de edición génica bien *in vitro* o *in vivo*. Entre esas características cabe destacar: la gran capacidad de empaquetamiento, los altos títulos alcanzados en el proceso de producción, su amplio tropismo y alta eficiencia de transducción tanto de células en división como quiescentes, la elevada estabilidad de los adenovirus recombinantes así como la expresión del material génico de forma episomal (Chen y Goncalves, 2016).

Para poder introducir material génico exógeno mediante estos vectores ha sido necesario delecionar ciertas regiones del ADN adenoviral (Figura 11). Se han llegado incluso a utilizar vectores AdVs desprovistos de todos sus genes virales. Estos vectores conocidos como “*gutless*” (vectores de tercera generación) han sido empleados para empaquetar y transferir moléculas de ADN molde de gran tamaño (18,6 Kb de brazos de homología) (Ohbayashi *et al.*, 2005).

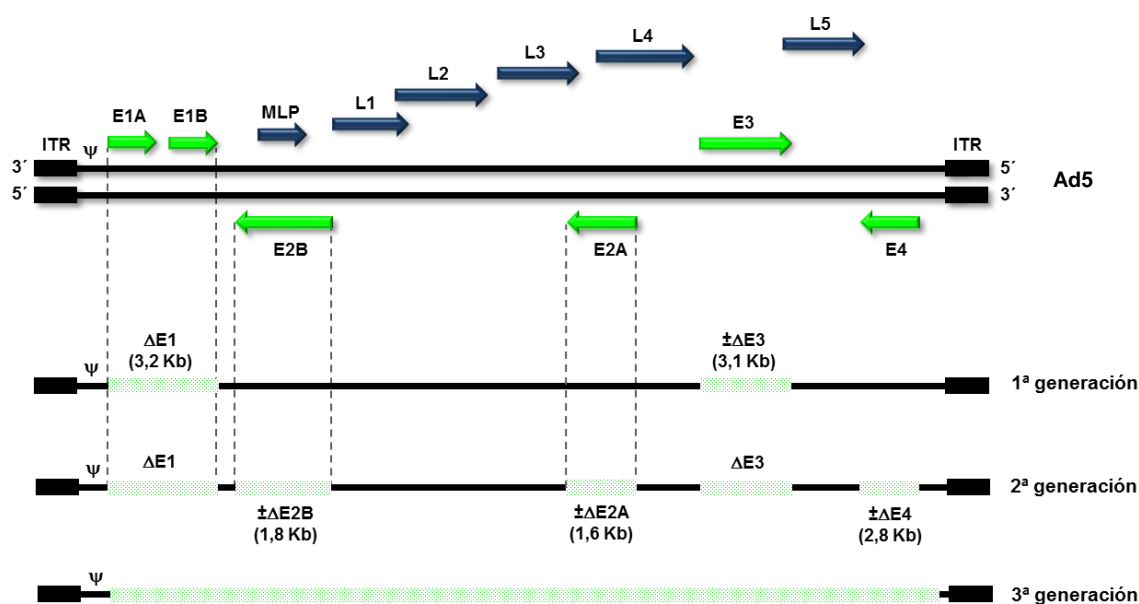


Figura 11. Organización del genoma del adenovirus tipo 5 (subgrupo C) y de las diferentes generaciones de vectores adenovirales. El genoma del Ad5 está compuesto por 36 Kb de ADN bicatenario lineal sumamente condensado. Los genes de transcripción temprana (E1, E2, E3 y E4) codifican proteínas implicadas en la regulación de genes (virales y del hospedador) y en la replicación del ADN. Los productos de los genes de transcripción de fase tardía (L1-L5) son responsables de la maduración y ensamblaje del virión. Los vectores de 1ª generación aceptan insertos de hasta 8 Kb, los de 2ª generación hasta 14 Kb y los vectores "gutless" (3ª generación) tienen una capacidad de hasta 37 Kb. Estos últimos carecen de todos los genes virales y sólo conservan las secuencias que actúan en *cis* (ITRs y la secuencia Ψ). En el esquema, las regiones delecionadas se representan con cajas de color verde claro y, entre paréntesis, se indica el tamaño máximo de cada deleción. Para la producción de los vectores adenovirales se requieren líneas celulares que expresen en *trans* aquellos genes virales que han sido eliminados del vector y que son imprescindibles para su propagación, o la utilización de virus auxiliador en el caso de los vectores de tercera generación. Ψ : secuencia de empaquetamiento.

A parte del número creciente de ensayos clínicos llevados a cabo para su evaluación, por ejemplo, como vacunas recombinantes e incluso como agentes oncolíticos (Majhen *et al.*, 2014; Russell *et al.*, 2012), su importancia en el campo de la edición génica también ha quedado demostrada. La introducción en células T CD4⁺ de ZFNs mediada por AdV para la supresión de la expresión del gen CCR5 co-receptor del VIH representa el primer ejemplo de edición génica traslacional (Tebas *et al.*, 2014).

- Vectores adenoasociados

Los virus adenoasociados no han suscitado gran interés médico debido a que no se asocian con ninguna patología en humanos. De hecho, cerca del 80% de la población humana es seropositiva para el subtipo más común, el AAV2 (AAV serotipo 2). Sin embargo, el estudio de los AAVs aumentó drásticamente a partir de finales de los años 90 tras demostrarse su potencial para la transducción *in vivo* de múltiples tejidos así como su eficacia para promover la frecuencia de recombinación homóloga cuando son utilizados para portar ADN molde (Russell y Hirata, 1998). Desde entonces el interés por su potencial en terapia génica ha ido en aumento.

Los virus adenoasociados son virus pequeños, no patogénicos, sin envoltura que pertenecen a la familia *Parvoviridae*. Debido a que la infección por AAVs ocurre sólo en presencia de un virus auxiliar, tal como un adenovirus o un virus herpes, se les ha clasificado dentro del género *Dependovirus*.

El genoma de los AAVs es ADN de cadena sencilla de, aproximadamente, 4,7 kilobases (Kb) y contiene dos repeticiones terminales invertidas o ITRs (del inglés *Inverted Terminal Repeats*) que flanquean dos genes, *rep* y *cap*, los cuales codifican las proteínas que median la replicación y el ensamblaje de la cápside, respectivamente. Mediante *splicing* alternativo y diferentes codones de inicio de la transcripción, el gen *rep* se traduce en cuatro proteínas (Rep78/Rep68 y Rep52/Rep40) que son esenciales para la replicación viral, integración, regulación transcripcional y ensamblaje. El gen *cap* se traduce en tres proteínas estructurales (VP1, 2 y 3) que se autoensamblan en una partícula icosaédrica de ~26 nm de diámetro y, mediante el uso de un marco de lectura alternativo, la proteína activadora del ensamblaje (AAP, del inglés *Assembly-Activating Protein*) asiste en la formación de la cápside (Sonntag *et al.*, 2010).

Las ITRs, secuencias palindrómicas que forman una estructura de horquilla en forma de T con sitios específicos de unión para las proteínas Rep, son los únicos elementos en *cis* necesarios para la replicación y el empaquetamiento viral, mientras que los genes *rep* y *cap* pueden funcionar en *trans* participando en el ensamblaje del virión y la producción de AAVs (Weitzman *et al.*, 1994). Ésto hace posible que todas las secuencias codificantes del genoma viral puedan ser reemplazadas por una determinada secuencia de interés como, por ejemplo, un casete convencional de expresión con la finalidad de expresar un determinado transgén en la célula diana, o una secuencia que actúe como ADN molde para la edición génica dirigida por recombinación homóloga (Figura 12). Para la producción de AAV recombinantes (AAVr) es necesario aportar las proteínas Rep y Cap en *trans* junto con los elementos necesarios del virus auxiliar (Gaj *et al.*, 2016).

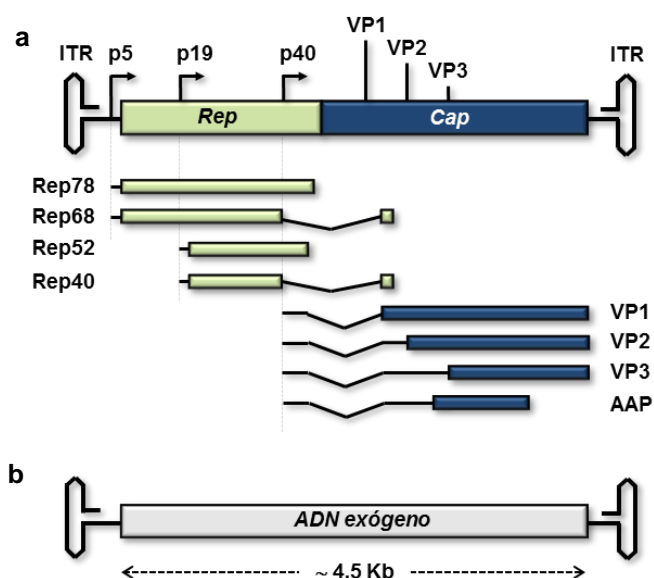


Figura 12. a) Organización del genoma del virus adenoasociado serotipo 2 (AAV2). Las repeticiones terminales invertidas (ITRs) contienen secuencias palindrómicas que forman una estructura de horquilla en forma de T y sirven como señal de empaquetamiento y origen de la replicación. b) La eliminación de los genes Rep y Cap permite empaquetar insertos de ~4,5 Kb.

Debido a que los vectores virales adenoasociados recombinantes carecen de un mecanismo de integración, una vez que alcanzan el núcleo de la célula diana la mayoría de sus genomas permanecen en un estado episomal, sólo una pequeña fracción de ellos se integran en el ADN celular (0,1-0,5 integraciones por unidad infectiva) presumiblemente en DSBs cromosómicas producidas espontáneamente (Miller *et al.*, 2004).

En la Tabla 2 se recopilan las principales características de los dos sistemas virales que han sido tratados en este apartado como vectores de edición génica.

Principales características	AdV	AAVr
Familia, género parental (prototipo)	<i>Adenoviridae</i> , Mastadenovirus (HAdV-5)	<i>Parvoviridae</i> , Dependovirus (AAV-2)
Estructura de las partículas (forma)	Sin envuelta, cápside proteica con 12 fibras triméricas (icosaédrica)	Sin envuelta, cápside proteica sin fibras (icosaédrica)
Tamaño de las partículas	~90-100 nm	~26 nm
Polimerasas genoma del vector	ADN polimerasas codificadas por el virus	ADN polimerasas celulares
Entrada a la célula	Endocitosis mediada por receptor, vesículas recubiertas de clatrina	
Estado genoma del vector en el núcleo de células transducidas	Episomal	
Capacidad efectiva de empaquetamiento	5-37 Kb ^a	~4,5 Kb
Compatibilidad entre capacidad de empaquetamiento y tamaño de las nucleasas de diseño ^b	++ / +++	+
Eficiencia de transducción (estado de las células)	Alta (células en división y quiescentes)	
Modificación del tropismo por pseudotipado	Sencillo	
Tiempo de producción	>1 mes	< 2 semanas
Producción del vector a gran escala	+++	++
Estabilidad partícula del vector	++	+++
Genes virales ^c	Presentes o ausentes	Ausentes
Nivel de expresión del transgén	+++	++

Tabla 2. Visión general de las principales características de los vectores adenovirales (AdV) y adenoasociados (AAVr). ^a La capacidad de empaquetamiento de los vectores AdV depende del sistema empleado y varía desde ~5Kb para los vectores de primera generación con delección únicamente de *E1* hasta ~37 Kb para los vectores “gutless” de tercera generación. ^b El tamaño de las nucleasas ZFN y de las TALENs es de 1,2 Kb y 3,0 Kb por monómero, respectivamente. La longitud combinada de la Cas9 de *S. pyogenes* más una guía típica (ARNg) está alrededor de las 4,4 Kb. ^c Los vectores AAVr y los AdV “gutless” se pueden construir sin que ningún gen del virus parental esté presente.

II. OBJETIVOS

Aunque se han conseguido importantes avances en el campo de la terapia génica y celular, actualmente no existe una terapia específica y efectiva para la EBDR. La gravedad de esta enfermedad unida a la alta prevalencia en la población de pacientes españoles de una mutación en particular, constituyen argumentos sólidos para el desarrollo de estrategias terapéuticas eficaces, seguras y a medida para dichos pacientes.

Por todo ello, se propuso como objetivo principal de la presente Tesis Doctoral el desarrollo de protocolos bioseguros de edición génica para la corrección de la mutación c.6527insC, altamente prevalente en la población de pacientes españoles con EBDR.

Este objetivo general se desglosa en los siguientes objetivos específicos:

1. Desarrollo de un modelo celular de EBDR que reproduzca fielmente el fenotipo ampolloso de la enfermedad y que sirva como instrumento eficaz para el ensayo de estrategias de terapia génica.

- 1.1. Establecimiento de una línea celular generada a partir de queratinocitos primarios de un paciente portador en homocigosis de la mutación c.6527insC.
- 1.2. Caracterización de la línea celular y evaluación como sistema modelo.

2. Desarrollo y ensayo en el modelo celular de EBDR de aproximaciones terapéuticas basadas en técnicas de edición génica.

- 2.1. Diseño y construcción de herramientas moleculares de edición génica: vectores adenovirales para la expresión eficiente de nucleasas TALEN y vectores adenoasociados para la introducción de construcciones de *targeting*.
- 2.2. Corrección de la mutación c.6527insC por recombinación homóloga.
- 2.3. Edición del gen *COL7A1* mediante el mecanismo de NHEJ.

3. Corrección mediante edición génica de queratinocitos primarios de paciente EBDR portador en homocigosis de la mutación c.6527insC.

- 3.1. Obtención de clones corregidos con capacidad proliferativa.
- 3.2. Análisis del potencial de regeneración cutánea a largo plazo de los clones corregidos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención de queratinocitos primarios de paciente

Los queratinocitos humanos se obtuvieron, previo consentimiento informado y de acuerdo al Comité de Ética del hospital correspondiente, a partir de biopsias de piel de un paciente EBDR homocigoto para la mutación c.6527insC del gen *COL7A1* (paciente #4 descrito en Escamez *et al.*, 2010). Los queratinocitos extraídos tras someter las biopsias cutáneas a varios ciclos de disgregación mecánica y digestión enzimática con tripsina 0,25%-EDTA 0,02% (Sigma), se cultivaron sobre una capa de *feeder* (fibroblastos de ratón 3T3-J2 letalmente irradiados con rayos X (50 Gy)).

2. Cultivo de queratinocitos humanos

El medio de siembra de queratinocitos está formado por una mezcla de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (GIBCO-BRL) y HAM'S F12 (GIBCO-BRL) en proporción 3:1, suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (HyClone), antibiótico Primocin 100 µg/ml (InvivoGen), toxina colérica (0,1 nM, Sigma), insulina (5 mg/mL, Sigma), adenina (2,43 ng/mL, Sigma), hidrocortisona (0,4 mg/mL, Sigma) y tirosina-triyodada (2nM, Sigma). Tras mantener los queratinocitos en medio de siembra durante 48 h para favorecer la adhesión celular, se sustituyó este medio por el medio de crecimiento (medio de siembra complementado con 10 ng/mL de EGF, Sigma)) y se renovó regularmente cada 48- 72 h dependiendo del estado metabólico de las células. Los cultivos celulares se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera saturada de humedad con un 5% de CO₂ (incubador de CO₂, NAPCO).

Cuando el cultivo alcanzó aproximadamente un 90% de confluencia se procedió al subcultivo celular. Para ello, tras lavar la capa de células con PBS para eliminar los restos de suero, las células se disociaron de la superficie de crecimiento enzimáticamente mediante la adición de tripsina 0,05%-EDTA 0,02% (Sigma) e incubación durante 15 minutos a 37 °C. Una vez transcurrido este tiempo y comprobada la separación de las células, se procedió a la inactivación de la acción enzimática de la tripsina mediante la adición de medio de cultivo con suero (DMEM-10% FBS).

Para su preservación, las células se congelaron en nitrógeno líquido. Para ello, células crecidas hasta un 70-80% de confluencia (fase exponencial de crecimiento) se lavaron con PBS y se tripsinizaron. Tras la inactivación de la tripsina con DMEM-10% FBS las células en suspensión se centrifugaron a 1000 rpm durante 7 min. El pellet celular obtenido se resuspendió en el denominado "Medio de Congelación", compuesto por FBS previamente inactivado al que se le añadió dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) al 10% (v/v) como agente criopreservante. Las células resuspendidas en el medio de congelación se distribuyeron en criotubos (Nunc) a razón de 1 mL por criotubo y se sometieron a una congelación progresiva hasta su almacenaje definitivo en nitrógeno líquido a una temperatura de -196 °C.

Todo el trabajo experimental llevado a cabo con células se realizó en todo momento en condiciones de asepsia en una cabina de flujo laminar de bioseguridad nivel II y utilizando materiales y soluciones estériles previamente atemperadas a 37°C.

3. Extracción de ADN

3.1. ADN genómico

Para la extracción de ADN genómico, células en cultivo se tripsinizaron y lavaron en PBS por centrifugación durante 4 min a 3000 rpm. El pellet celular se resuspendió en 500 µL de tampón de lisis Tris HCl 20mM, pH8; EDTA 5mM, pH8; NaCl 400mM, y SDS 1% y, tras agregar 20 µl de proteinasa K (20µg/µl), los lisados celulares se incubaron a 55 °C durante 16 h. La precipitación del ADN se llevó a cabo añadiendo 0,7 volúmenes de isopropanol (Scharlau). El ADN precipitado se centrifugó y, tras retirar el sobrenadante, se añadió 1 mL de etanol al 75% (Scharlau) para la eliminación de las sales residuales. Una vez centrifugado y eliminado completamente el sobrenadante, el ADN se dejó secar totalmente. Finalmente, se añadió tampón TE 1X (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 7,5) para su resuspensión.

3.2. ADN plasmídico

Para la extracción de ADN plasmídico a pequeña escala, se partió de 2 mL de cultivo de bacterias transformadas XL1-Blue (Stratagene) en LB con el antibiótico de selección correspondiente. El pellet bacteriano obtenido tras centrifugación del cultivo durante 5 min a 7500 rpm se resuspendió en 200 µL de tampón de resuspensión (Glucosa 50mM, Tris-Cl 25mM, pH8; EDTA10mM, pH8). A continuación, se añadieron 250 µL de solución de lisis (NaOH 0,2N, 1% SDS) y 4 µL de RNasa (10 mg/ml) (Sigma), se mezcló por inversión y se mantuvo durante 5 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se añadieron 250 µl de solución de neutralización (60 ml de AcK 5M, 11,5 ml de ácido acético glacial, 28,5 ml de H₂O), se mezcló nuevamente por inversión y se mantuvo 3 min en hielo. Tras centrifugar 10 min a 12.000 rpm, se recogieron 500 µL del sobrenadante y se añadió 1 mL de etanol absoluto frío para precipitar el ADN plasmídico. Tras centrifugación a 12000 rpm durante 20 min a 4 °C, se retiró el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 mL de etanol al 75%. Después de centrifugar a 12000 rpm 3 min, el pellet se dejó secar totalmente y se resuspendió en 50 µL de tampón TE 1X.

3.3. ADN adenoviral

Para la extracción de ADN adenoviral, se partió de 50 µL del purificado obtenido por ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio, al que se añadió 50 µL de tampón de lisis (Tris HCl 20mM, pH8; EDTA 5mM, pH8; NaCl 400mM, y SDS 1%) y 3 µL de proteinasa K (20µg/µl). Tras incubación durante 30 min a 55 °C, se precipitó el ADN con 0,7 volúmenes de isopropanol y se centrifugó a 13.200 rpm a 4 °C durante 30 min. El ADN se lavó con 1 mL de etanol al 70 % y se resuspendió en 40 µL de tampón TE 1X.

4. Inmortalización de queratinocitos de paciente EBDR

La inmortalización de queratinocitos de paciente EBDR se llevó a cabo mediante transducción con los sobrenadantes retrovirales generados con el vector retroviral pLXSN16E6E7 (Addgene). Este vector codifica para las proteínas E6 y E7 del virus del papiloma humano tipo 16 (HPV-16). Paso previo a la inmortalización, el gen *neo* del plásmido pLXSN16E6E7 se eliminó para no interferir con

los experimentos de recombinación homóloga. Para ello, se digirió el plásmido con BamHI y RsrII, se aisló la banda de 5664 pb y se religó en roto.

Los sobrenadantes retrovirales se generaron mediante cotransfección transitoria de tres plásmidos en la línea celular 293-T: un plásmido empaquetador portador de los genes gag-pol, un plásmido portador del gen env que codifica para la envuelta anfotrópica 4070 y el plásmido pLXSN16E6E7. La cotransfección se realizó mediante el método de precipitación con fosfato cálcico. A las 24 h de la transfección, se cambió el medio DMEM-10% FBS por medio definido CnT-BM.1 (CELLnTEC Advanced Cell Systems). A las 24 y 48 horas, los sobrenadantes con las partículas retrovirales se recogieron, se filtraron por filtros de tamaño de poro 0,22 µm y, tras añadir polibreno (8 µg/ml), se usaron para infectar los queratinocitos primarios de paciente EBDR. La incubación se llevó a cabo durante 6 horas y este proceso se realizó dos veces, en dos días consecutivos. Después de la transducción, los queratinocitos fueron sometidos a pases sucesivos a un ratio 1:4 en medio definido CnT-BM.1. A partir del pase 5 (aproximadamente 20 duplicaciones de la población celular) las células se cultivaron en una mezcla en proporción 1:1 de medio de crecimiento de queratinocitos y medio definido CnT-BM.1. Al llegar al pase 24 y, tras alcanzar un 70-80% de confluencia, las células fueron tripsinizadas y sembradas en placas de 96 pocillos de fondo plano (Nunc) a una concentración de 0,8 células/pocillo para la obtención de clones por dilución límite.

5. Ensayos de proliferación celular y clonogenicidad

Para el ensayo de proliferación celular, se sembraron células de la línea RDEB-E67A6 y del *pool* celular RDEB-E67 en frascos de cultivo de 25 cm² a una densidad de plaqueo de 10⁴ células/frasco. Las células se cultivaron en condiciones de cultivo *in vitro*, con medio de crecimiento de queratinocitos suplementado al 10% de FBS y en presencia de *feeder layer*. A los 2, 5 y 6 días de la siembra, las células se tripsinizaron y contabilizaron en cámara de Neubauer.

Para el ensayo de formación de colonias, células de la línea RDEB-E67A6 y del *pool* celular RDEB-E67 fueron sembradas en placas de 100 mm (por cuadruplicado) a densidades de plaqueo de 200 y 500 células/placa. Se cultivaron en condiciones de cultivo *in vitro*, en presencia de *feeder layer* y medio de crecimiento de queratinocitos. A los 12 días, las células fueron fijadas con formol y teñidas durante una hora con rodamina B (Merck) al 1% en formol para la visualización de las colonias. Tras contabilizar las colonias con un diámetro superior a 3 mm, se calculó la eficiencia de formación de colonias como:

$$CFE = \frac{N^{\circ} \text{ de colonias contabilizadas}}{N^{\circ} \text{ de queratinocitos sembrados}} \times 100$$

6. Detección de la mutación c.6527insC por PCR-RFLP

La presencia de la mutación c.6527insC en la línea RDEB-E67A6 se determinó mediante el análisis del tamaño de los fragmentos de restricción que se obtienen tras la digestión con BglII del producto de PCR que resulta al amplificar un fragmento del gen COL7A1 con los oligonucleótidos

79F: 5'-GTAAGTCCTTGCCCAACAGC-3' y 83-85R: 5'-CTGCCTGTCGACCCTTGACC-3'. La PCR se llevó a cabo empleando el siguiente programa:

- 94 °C 3 min.
- (94 °C 45 s, 68 °C 30 s, 72 °C 1 min 30 s) x 5 ciclos (la temperatura de anillamiento disminuye 1 °C en cada ciclo)
- (94 °C 45 s, 63 °C 30 s, 72 °C 1 min 30 s) x 30 ciclos
- 72 °C 7 min

Los productos de la digestión se resolvieron por electroforesis en un gel de agarosa al 2% (p/v) en tampón TBE (Tris Borato EDTA) 1X y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio en el analizador *Geldoc XR* (BioRad Laboratories) y el software Quantity one (BioRad).

7. Diferenciación de queratinocitos en cultivo inducida por calcio

La capacidad de las células inmortalizadas RDEB-E67A6 para diferenciar *in vitro* se evaluó tras un aumento de la concentración de calcio en el medio de crecimiento. Para ello, se sembraron células de la línea RDEB-E67A6 y queratinocitos humanos primarios normales a una densidad de 4700 células/cm² en medio definido bajo en calcio CnT-BM.1 (0,07 mM de calcio). 24 horas después de la siembra, se retiró el medio CnT-BM.1 y se añadió DMEM suplementado al 10% de FBS conteniendo 1,6 mM de calcio. El proceso de diferenciación celular se mantuvo durante cuatro días y todos los experimentos se hicieron por triplicado. Posteriormente se realizaron inmunofluorescencias para queratina K1 y K10. La naturaleza epidérmica de las células se monitorizó mediante la expresión de la queratina K5.

8. Ensayo de tumorigénesis *in vivo*

El potencial tumorigénico de la línea inmortalizada RDEB-E67A6 se evaluó mediante su inoculación en ratones inmunodeficientes (*nu/nu*). Para ello, queratinocitos en cultivo en fase exponencial de crecimiento se tripsinizaron y resuspendieron en PBS a una concentración de 10⁷ células/mL, siendo inyectado subcutáneamente en cada flanco un volumen de 100 µL de la suspensión celular (10⁶ células). Un total de 3 ratones fueron empleados en el experimento. Posteriormente, se realizó un seguimiento de los ratones durante 6 meses determinándose cada semana, por palpación, la aparición de tumores en la zona de inoculación de las células. Como control positivo se inyectaron células de la línea A431 (células de carcinoma epidermoide humano) en los flancos de otros dos ratones *nu/nu* siguiendo el mismo procedimiento descrito para la línea RDEB-E67A6.

9. Cariotipo espectral multicolor (SKY)

El análisis citogenético de la línea RDEB-E67A6 y del *pool* celular RDEB-E67 mediante cariotipo espectral multicolor fue realizado por el grupo de Citogenética Molecular del Dr. Cigudosa del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) según el método SKY y de acuerdo con el protocolo del fabricante (Applied Spectral Imaging, Migdal Ha'Emek, Israel).

Brevemente, esta técnica se basa en el empleo simultáneo de un cóctel de 24 sondas de pintado cromosómico marcadas con distintas combinaciones de fluorocromos que se hibridan sobre los cromosomas de una misma metafase de manera que el espectro de emisión de cada cromosoma es único y diferenciable de los demás. Las diferencias espectrales de cada pareja de cromosomas son capturadas y analizadas por un equipo acoplado a un microscopio de fluorescencia, en nuestro caso, las imágenes se adquirieron mediante un microscopio Zeiss Axioplan, con un filtro adaptado para SKY (SKY-1; Chroma Technology, Brattleboro, VT), acoplado a una cámara digital, SD300 Spectra Cube (Applied Spectral Imaging) todo ello controlado a través del programa informático SKYView® (Applied Spectral Imaging Ltd, Migdal HaEmek, Israel). Un total de 15 metafases fueron capturadas y analizadas para cada caso.

10. Transducción de queratinocitos con el vector retroviral HuCol7-pLZRS-Ires-Zeo

10 µg del plásmido recombinante HuCol7-pLZRS-Ires-Zeo se transfectaron, junto con el plásmido portador de los genes gag-pol y el plásmido portador del gen env (envuelta anfitriónica 4070), en la línea 293-T para la generación de retrovirus recombinantes conteniendo la construcción indicada en la Figura 13. La cotransfección se realizó mediante el método de precipitación con fosfato cálcico.

Posteriormente, queratinocitos RDEB-E67A6 se infectaron en presencia de polibreno (8 µg/ml) con la suspensión viral recogida durante dos días consecutivos. Transcurridas 48 h desde la transducción, se adicionó al medio de crecimiento de queratinocitos el antibiótico de selección zeocina (200 µg/mL). Al cabo de 7 días de selección, la expresión de colágeno VII se evaluó por inmunofluorescencia usando el anticuerpo monoclonal anti-colágeno VII (mAb) LH7.2 (Chemicon International).

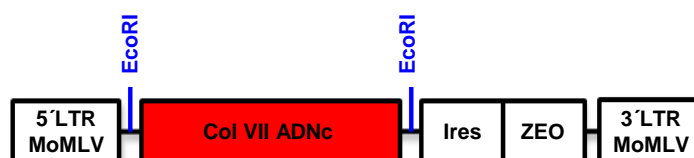


Figura 13. Representación esquemática del vector retroviral empleado para la expresión de colágeno tipo VII en queratinocitos humanos EBDR inmortalizados. El vector contiene las repeticiones terminales largas del virus del sarcoma murino de Moloney (5' y 3'LTRs MoMLV), el ADNc del colágeno VII (número de acceso GenBank: L02870), un sitio interno de unión de ribosomas (IRES) y el gen de resistencia a zeocina (ZEO). El ADNc de 9,2 Kb del gen *COL7A1* (caja roja) está clonado en el sitio de restricción EcoRI del vector pLZRS-Ires-Zeo. Este vector expresa un ARN mensajero bicistrónico Col7-Zeo que permite la selección de las células transducidas.

11. Diseño y construcción de nucleasas TALEN

Las nucleasas TALEN se construyeron usando el kit Golden Gate Talen distribuido por Addgene (Cambridge, MA) y siguiendo el protocolo descrito (Cermak *et al.*, 2011). El vector destino pCAG-T7-TALEN fue usado para construir proteínas TALEN con el diseño +63. El vector destino diseñado para la expresión de TALENs con truncación del extremo C-terminal y fusionadas al péptido HA se generó por ligación de un adaptador en el sitio AatII/EcoRV de pTAL3. El adaptador se obtuvo tras hibridación de los oligonucleótidos 5'-TACCCATACGACGTCCCAGACTACGCGAT-3' y 5'-ATCGCTGAGTCTGGGACGTCTAGGTGTAACGT-3'. El fragmento BglII/AflII del plásmido

resultante se clonó en los sitios BamHI/AflII de un plásmido con promotor PGK y secuencias de poliadenilación para la obtención del vector destino PGK diseño +30+HA.

12. Análisis de sitios de corte fuera de diana de la pareja de TALENs T6/T7

La predicción *in silico* de los posibles sitios de corte fuera de diana de la pareja de nucleasas T6/T7 se realizó con la herramienta PROGNOS (*Predicted Report Of Genomewide Off-targets Sites*) (Fine *et al.*, 2014a) disponible online en la página <http://bao.rice.edu/Research/BioinformaticTools/prognos.html>. Antes del inicio del escaneado en busca de potenciales sitios de corte, se configuraron una serie de parámetros como el genoma a analizar (hg19) y la longitud de las secuencias espaciadoras. Además se incluyó en el análisis el estudio de potenciales sitios de unión para las configuraciones homodiméricas. Para ayudar al análisis, el programa generó automáticamente secuencias de oligonucleótidos para la amplificación, con alto rendimiento, de los sitios de corte candidatos (Tabla 3). Los productos de PCR fueron posteriormente analizados mediante el ensayo de CEL-1.

#	Gen	Oligonucleótido directo (Secuencia 5 → 3')	Oligonucleótido reverso (Secuencia 5 → 3')	Producto PCR (pb)	Productos digestión CEL I (pb)
	COL7A1	GTGAGTGGTGGCTGAAGCAC	ACCCACCAAGGAACTGA	495	381, 114
1	NFIX	CTAGGCTTGAAGTGTCTGATGTGTG	CAACTCCAATGGGGGAAGCC	357	216, 141
2	TPCN1	AGGGGAGAGCTGTTTTGGGC	AATCAAAGAGAACACGTGGCCGG	326	125, 201
3	GDF5	CTGTGTCAAGCCTCCTGTCT	CCAAACCAGAGGCACCTTTGCT	330	127, 203
4	ARHGEF19	GAGTTCCTCTGTCTCTTCATGG	ATTGTGTGATCCACCTTCCAGA	326	201, 125
5	PROX1	AGATGGGTGCAAACCTCACCTTC	ATTTGGGCACAGGCGTCTGG	331	125, 206
6	LRIG1	TTCCAGGGAATGGGGGAAAGTG	GGGAAAAACAGTGGTTATCAGCATG CATAG	357	216, 141
7	-	CTCCCTGAGCGGGTGCTTTT	TGATGACGATGGCAGGGGCT	344	209, 135
8	CTSD	AGAAGTGACCACTGGCAGGG	CTGGAAGCCACCTAGCAAGC	345	135, 210
9	-	CTCATCTCTGCAGCTATCTGCTC	TGCTCCCATCTCCAAGCAGG	326	200, 126
10	RBFOX3	AGTTCACCAGCCCTACGCAG	GCTTTGGGCTTTTGCCAAGGG	327	201, 126
11	TBCB	AGACACCTCAGGGTGTTCCTTG	CAGCCTCCCAATGTACTGGGT	325	200, 125
12	COL7A1	AGCTCTGACTCCTGATCCCT	GGGACTATGGTGAGACTGCA	508	429, 80
14					434, 74
13	FAMD3	CTTTGGAGCAAAGCTGCAGGC	GAAGGGGCACCTTTACCTACTC	343	210, 133
15	-	CTGTCTCGATGCGATCCAGG	TGGTTAGACAATGGGTGCAGCC	325	200, 125
16	COL7A1	CCCAGGGTTCCTCCACAGG	CATGGTGAGGATGGGGGTAA	693	536, 157
17	COL7A1	GATCCCTGGAGCCCCCTCA	CACCCTGTGGAAAATAGAGTGGTAA	633	255, 378
18	COL7A1	CACAGGCCATGCTCCAAGA	GGCAGAACACAAAGGGGTCA	603	467, 136
19	COL7A1	GCTGGAGGCAGTGAAGACCA	TCCCAGCACCTTTGAGAGAC	452	204, 248
20	COL7A1	ACACACGCATCTGAAGGCTA	AGGTTTCAGAGGGACAGTGG	542	381, 161

Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos diseñados automáticamente por PROGNOS para la amplificación de potenciales sitios de corte de la TALEN T6/T7 de acuerdo a las especificaciones introducidas en la configuración de los parámetros de búsqueda. Se indica el tamaño del amplicón generado por cada pareja de oligonucleótidos así como el tamaño de los fragmentos que se obtendrían tras digestión con CEL-1 en el caso de que la TALEN presentara actividad en dichos sitios.

La PCR para la amplificación de los sitios candidatos se llevó a cabo con la polimerasa FastStart Taq DNA Polymerase (Roche Life Science) empleando el siguiente programa:

- 96 °C 5 min.
- (94 °C 30 s, 65 °C 30 s, 72 °C 45 s) x 5 ciclos (la temperatura de anillamiento disminuye 1°C en cada ciclo)
- (94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 45 s) x 30 ciclos
- 72 °C 7 min

13. Construcción de vectores adenovirales para la expresión de TALENs

3 µg de los plásmidos pGK-T7-TALEN (diseño +30+HA) portadores de las TALENs T1, T2, T6, T7, T13, T14 y T15 se digirieron con HindIII y, posteriormente, mediante la actividad polimerasa 5'→3' de la enzima Klenow (Roche) se procedió al relleno de los extremos 3'. El fragmento purificado mediante fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y, ahora con extremos romos, se religó. De esta manera, la diana para la enzima HindIII se convirtió en NheI. A continuación se llevó a cabo una digestión parcial con EcoRI y se aisló la banda de interés de 7 Kb con el kit QUIAEX Gel Extraction de Qiagen. Tras digestión con NheI del fragmento de 7 Kb, se purificó la banda de 4 Kb. Finalmente, se procedió a la clonación de este último fragmento en los sitios XbaI/EcoRI del plásmido pDC315-iGFP para la generación de los vectores lanzadera pDC315-TALEN-iresGFP.

14. Producción y purificación de adenovirus recombinantes para la expresión de TALENs

La generación de los vectores Ad-TALENs se llevó a cabo mediante el método de recombinación homóloga en células HEK293 (Ng *et al.*, 2000). Para ello se utilizaron dos plásmidos: el plásmido pBHGloxΔE1,3Cre (Microbix Biosystems) junto con los vectores lanzadera pDC315-TALEN-iresGFP. Puesto que el plásmido pBHGloxΔE1,3Cre contiene el genoma del adenovirus 5 excepto los genes *E1* y *E3* y, precisamente, el gen *E3* es dispensable para la replicación *in vitro*, estos vectores pudieron ser generados en la línea empaquetadora HEK293 la cual aporta exclusivamente las funciones de *E1* (esta línea presenta la inserción de la secuencia de *E1A* y *E1B*, nucleótidos 1- 4344 del genoma Ad5, en el cromosoma 19) (Graham *et al.*, 1977; Kovesdi y Hedley, 2010)).

La cotransfección de la línea empaquetadora HEK293 con el plásmido pBHGloxΔE1,3Cre y los correspondientes vectores lanzadera pDC315-TALEN-iresGFP se realizó con fosfato cálcico. Para ello, se partió de 10 placas de 60 mm (por virus a construir) con células 293 al 60-80% de confluencia crecidas en DMEM-10% FBS. Una hora antes de la transfección el medio de cultivo se reemplazó por MEM-10% FBS con cloroquina (25 µM). En tubos de 2 mL se mezclaron 3 µg del plásmido lanzadera adenoviral correspondiente, más 7 µg del plásmido pBHGloxΔE1,3Cre, llevando a un volumen final de 250 µL con agua estéril. Seguidamente se añadieron 30 µL de CaCl₂ 2,5 M y 250 µL de HBS 2X (HEPES 100 mM (GibcoBRL); NaCl 281 mM; Na₂HPO₄ 1,5 mM; pH 7,13), se burbujeó inmediatamente durante 30 s para conseguir la formación de precipitados de Ca²⁺-ADN y se añadió gota a gota al cultivo de HEK293. Tras mover suavemente la placa para permitir la distribución uniforme del ADN, las células transfectadas se incubaron a 37 °C. Pasadas 24 h de la transfección,

se retiró el medio y se cubrió la capa de células de cada placa con una mezcla equilibrada a 44 °C constituida por: 5 mL de MEM2X-10% FBS, 2X antibiótico penicilina-estreptomicina y 0,2% de extracto de levadura (Pronadisa); y 5 mL de agarosa al 1% (D1- low EEO, Pronadisa). Transcurridos 15 - 20 días se procedió al aislamiento de las placas de lisis que presentaban un diámetro de 2- 3 mm. Los tapones de agar aspirados con ayuda de una pipeta Pasteur se guardaron a -80 °C en criotubos conteniendo 1 mL de PBS +/- (PBS con calcio y magnesio) al 10% de glicerol. Para la verificación de las placas de adenovirus aisladas, se tomaron 400 µL de cada suspensión con adenovirus y se añadieron sobre placas de 60 mm de HEK293 subconfluentes previa retirada del medio de cultivo. Tras 1 h de adsorción con agitación periódica cada 15 min, se añadió a cada placa 5 mL de MEM suplementado con 5% de suero de caballo y se incubaron a 37°C. Transcurridos 4- 5 días y comprobado que más del 80% de las células estaban despegadas, se recogieron junto con el medio de cultivo y se centrifugaron a 1000 rpm durante 7 min. Los sobrenadantes se guardaron con un 10% de glicerol a -80 °C y de los pellets celulares se extrajo ADN genómico para la verificación del genoma viral mediante el análisis de los fragmentos de restricción generados tras digestión con EcoRI. La amplificación de los adenovirus recombinantes se realizó en células HEK293 cultivadas en placas de 150 mm (30 placas por virus a amplificar) al 80% de confluencia e inoculadas con los sobrenadantes obtenidos en el paso anterior. Una vez que el efecto citopático fue evidente, se recogieron las células por centrifugación. Los pellets celulares se lisaron con 3 ciclos de congelación/descongelación y se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 min. El sobrenadante se depositó sobre un gradiente de cloruro de cesio en tubos de 14 x 95 mm (UltraCear™, Beckman) y se ultracentrifugaron a 35.000 rpm a 10 °C durante 3 horas (ultracentífuga Beckman Coulter Optima™ L-100 XP) con el rotor SW40Ti. Transcurrido el tiempo de centrifugación, la banda de adenovirus formada en la interfase entre las soluciones de CsCl de 1,35 y 1,25 g/mL (Figura 14) se extrajo con una jeringa y se pasó por una columna de exclusión molecular pD10 (Amersham) para su desalación. Tras añadir un 10% de glicerol los adenovirus se preservaron a -80 °C.

La cuantificación de los adenovirus recombinantes purificados se determinó midiendo la A_{260} de las fracciones obtenidas, previa lisis con SDS al 5%, y según la siguiente fórmula:

$$\text{partículas virales (PV)/mL} = \text{DO}_{260 \text{ nm}} \times \text{factor de dilución} \times (1,1 \times 10^{12})$$

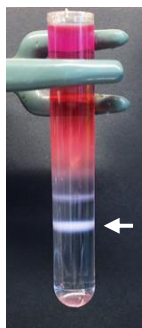


Figura 14. Imagen de las dos bandas que se obtienen tras ultracentrifugar los lisados celulares de HEK293 en un gradiente de cloruro de cesio para la concentración y purificación de los adenovirus recombinantes. La banda gruesa inferior (flecha blanca) contiene partículas virales completas mientras que la superior contiene partículas vacías.

El genoma de los adenovirus recombinantes purificados se comprobó por digestión con EcoRI. Para la secuenciación de la región correspondiente al dominio central de las TALENs se emplearon los oligonucleótidos TAL_Seq_5-1 (5'-CATCGCGCAATGCACTGAC-3') y TAL_R3 (5'-GGCTCAGC TGGGCCACAATG-3').

15. Análisis de la actividad nucleasa: ensayo Cel I (Surveyor)

Para la determinación de la actividad nucleasa de las TALENs en células 293-T transfectadas transitoriamente con los vectores plasmídicos así como en queratinocitos primarios de paciente y de la línea RDEB-E67A6 infectados con los adenovirus portadores de dichas nucleasas, se amplificaron por PCR fragmentos que contenían los correspondientes sitios de corte. Para ello se utilizaron las parejas de oligonucleótidos F1/R, F2/R y 80F/82R. F1: 5'- GTGAGTGGTGGCTGAAGCAC-3', F2: 5'-TCTGTGTGTGGTTGTATGTGGA-3', R: 5'-ACCCACCAAGGAACTGA-3', 80F: 5'-CAAGTGAGGC CCAGATTGAG-3'; 82R: 5'-GGCATGGACACAGCTTGAAG-3'. Los productos de PCR se sometieron al siguiente programa para la formación de heterodúplex: 95°C 10 min, 95°C a 85°C (2°C/ s), 85°C a 25°C (0.1°C/ s) y se digirieron con la nucleasa Surveyor (Transgenomic SURVEYOR Mutation Detection Kit for Standard Gel Electrophoresis (Transgenomic, NE, USA)) (Qiu *et al.*, 2004) a 42 °C durante 1 hora. Los productos de la digestión se resolvieron en un gel de agarosa de alta resolución (MS-8, Conda) al 1,5 % (p/v) en tampón TBE 1X y, tras cuantificar la intensidad de las bandas con el programa ImageJ, se calculó el porcentaje de corte como:

$$\% \text{ de corte} = \left(\frac{b + c}{a + b + c} \right) \times 100$$

donde *a* es la intensidad de la banda correspondiente al producto de PCR no digerido y *b* y *c* las intensidades de las bandas resultantes de la digestión.

16. Experimentos de edición génica mediada por el mecanismo de NHEJ

16.1. Experimentos en la línea RDEB-E67A6

Para los experimentos de NHEJ en la línea inmortalizada, queratinocitos RDEB-E67A6 se transdujeron en suspensión con los vectores adenovirales portadores de las TALENs T6 y T7 a una MOI de 1000 en presencia de polibreno (8 µg/ml). 1×10^6 de células transducidas se sembraron en una placa de 35 mm en medio de crecimiento de queratinocitos (con suero previamente inactivado por calor a 56 °C durante 30 min) y se mantuvieron a 37 °C durante 24 horas. Al día siguiente, tras renovar el medio de cultivo, se pasaron a un incubador a 30 °C en el que permanecieron 48 horas. Posteriormente, las células se tripsinizaron y la mitad se pasó a un frasco de cultivo de 25 cm² con *feeder layer* y medio de crecimiento de queratinocitos, y la otra mitad se destinó a la extracción de ADN genómico según protocolo detallado en el apartado 3.1 para verificar, mediante el ensayo de Cel I (apartado 15), la presencia de *indels* en el *pool* celular. Cuando las células del frasco de 25 cm² alcanzaron el 80-90% de confluencia se levantaron por tripsinización y se obtuvieron clones por dilución límite. Para ello, se sembraron los queratinocitos en placas de 96 pocillos a una concentración de 0,8 células/pocillo junto con

feeder layer (aproximadamente 20000 células/pocillo). Un total de 113 clones fueron expandidos para análisis posteriores.

16.2. Experimentos en queratinocitos primarios de paciente

Queratinocitos primarios de paciente EBDR homocigoto para la mutación c.6527insC y nulo para la expresión de ColVII se transdujeron, a una MOI de 300 y en presencia de polibreno (8 µg/ml), con los vectores adenovirales Ad-T6 y Ad-T7. Las células transducidas se sembraron en medio definido CnT-BM.1 a razón de 1×10^6 células por placa de 35 mm y se mantuvieron a 37°C durante 24 h y a 30°C durante las siguientes 48 h. Posteriormente, $\frac{1}{4}$ de p35 se pasó a 14 placas de 100 mm en medio de crecimiento de queratinocitos suplementado con el inhibidor de ROCK Y-27632 (Sigma) (10 µM) y en presencia de *feeder layer* (2×10^6 células por placa). Transcurridos aproximadamente 10 días se aislaron clones mediante el sistema de anillos de clonación (Sigma Aldrich) y se expandieron en frascos de 25 cm² para la extracción de ADN genómico y criopreservación en nitrógeno líquido.

17. Experimentos de *targeting*.

17.1. Construcción de vectores para la producción de AAV recombinantes portadores de las construcciones de *targeting*

Para la generación de los vectores de recombinación homóloga se amplificaron por PCR (Expand Long Template PCR system, Roche) dos fragmentos de ADN genómico humano correspondientes al locus del gen *COL7A1* para la obtención, en primer lugar, de los brazos de homología. Como ADN molde se utilizó el BAC RP11-148G20 y los oligonucleótidos Col7KI-B1-F: 5'- GCGGCCGCGGACTGGGAAAC-3' y Col7KI-B1-R: 5'-GCTAGCAAGCTTAGCACACACG GGCCTGAC-3' para la obtención del brazo izquierdo, y los oligonucleótidos Col7KI-B2-F: 5'- GGATCCTCTATGAGAGGCAGTCCATGG-3' y AAV-Br2-R: 5'- ACTAGTGAGGAACTCAGTGCC TC-3' para la amplificación del brazo derecho. Los fragmentos amplificados se clonaron en el vector pGEM-T (Promega) y se verificaron por secuenciación. Posteriormente, se subclonó secuencialmente en el plásmido pLoxP (conteniendo el casete floxeado PGK-neo), el brazo 3' como un fragmento BamHI/EcoRI y el brazo 5' como un fragmento NotI/HpaI. El fragmento SpeI/SpeI del plásmido resultante se clonó en los sitios XbaI del vector pSub201 el cual, al contener los elementos repetidos invertidos (ITRs), permitió la generación de partículas AAV recombinantes portando la construcción AAV-PGKneo (Figura 14).

El casete basado en la trampa de *splicing* (SA-2A-neo) se construyó mediante la técnica de PCR SOE (*Splicing by Overlap Extension*). Para ello, se sintetizaron mediante PCR fragmentos solapantes conteniendo la secuencia de acepción de *splicing* del primer intrón del gen de N4bp1, la secuencia del péptido 2A del teschovirus y la secuencia del gen de resistencia a la neomicina. Los fragmentos solapantes se construyeron con los siguientes oligonucleótidos:

- Para la amplificación de un fragmento de 248 pb (SA) incluyendo el sitio aceptor de *splicing* se usaron los oligonucleótidos SA-F: 5'-GGGCCCACTCTGTAAATTATACAAAG-3' y SA-R:

5'-AGGACCGGGGTTTTCTTCC-3' y como ADN molde una construcción previa con las secuencias SA-2A.

- Para la amplificación del fragmento con la secuencia del péptido 2A junto con la secuencia neo (sin el codón de inicio de la transducción ATG) se emplearon los oligonucleótidos 2A-F: 5'-GAAGAAAACCCCGGTCCTTTGATTGAAC-3' y 2A-R: 5'-CTCACCATAGGACCGGGGTTTTCTTC-3' y como ADN molde una construcción previa con las secuencias 2A-neo.

Ambos fragmentos se fusionaron en una reacción de PCR usando los oligonucleótidos SA-F y 2A-R. El producto final se clonó en el plásmido pGEM-T para su verificación completa por secuenciación. Finalmente, el fragmento XhoI/RsrII conteniendo el casete de trampa de *splicing* se clonó en los sitios XhoI/RsrII de la construcción AAV-PGK-neo para generar la construcción AAV-SA-2A-neo (Figura 15).

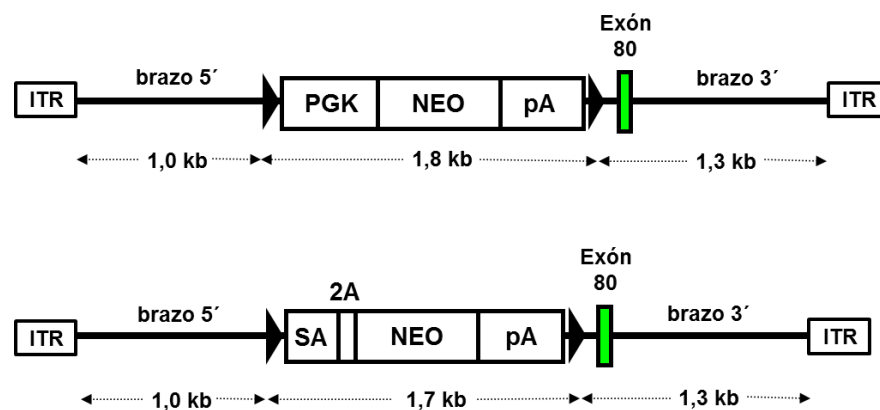


Figura 15. Vectores de *targeting* empleados para la producción de partículas AAVr: AAV-PGK-neo (superior) y AAV-SA-2A-neo (inferior). ITR, repeticiones terminales invertidas; PGK, promotor del gen de la fosfoglicerato quinasa; NEO, gen de resistencia a neomicina; pA, secuencia de poliadenilación; SA, sitio aceptor de *splicing*; 2A, péptido 2A del teschovirus. Los triángulos representan la secuencia loxP (secuencia de reconocimiento de la recombinasa Cre).

17.2. Producción y purificación de vectores AAVs recombinantes

La producción y purificación de vectores AAVr se llevó a cabo en el laboratorio de nuestra colaboradora Hildegard Büning del CMMC (Center for Molecular Medicine Cologne) (Universidad de Colonia). Resumidamente, células HEK293 se transfectaron mediante el método del fosfato cálcico con un total de 37,5 µg de plásmido empaquetador pRC-H1 o pRC-H3, las construcciones de *targeting* (AAV-PGKneo o AAV-SA-2A-neo) y el plásmido *helper* pXX6. Las células se recolectaron 48 h después de la transfección, se lisaron y se purificaron por centrifugación en un gradiente de iodixanol. El título viral se determinó por qPCR (LightCycler System, Roche Diagnostics) utilizando oligonucleótidos específicos del gen *neo*. El número de partículas virales que se obtuvieron por microlitro se muestra en la Tabla 4.

construcción de <i>targeting</i>	cápside	partículas virales/ μ l
PGK-neo	Kera1	$1,374 \times 10^8$
	Kera2	$1,26 \times 10^9$
SA-2A-neo	Kera1	1×10^9
	Kera2	$3,2 \times 10^8$

Tabla 4. Título viral obtenido en la purificación en gradiente de iodixanol de los AAVr portadores de las construcciones de *targeting* PGK-neo y SA-2A-neo. Se produjeron y purificaron vectores tanto con la cápside recombinante Kera1 como Kera2.

17.3. Transducción de queratinocitos de la línea RDEB-E67A6 con AAVr y Ad-TALENs.

Para los experimentos de *targeting*, se procedió a la infección en suspensión de células RDEB-E67A6 con los vectores adenovirales portadores de las nucleasas T6 y T7 ($\text{MOI } 1 \times 10^3$) junto con los vectores AAVs portadores de las construcciones de *targeting* ($\text{MOI } 3 \times 10^4$). Tras añadir polibreno ($8 \mu\text{g/ml}$) y sembrar 1×10^6 células en una placa de 35 mm sin *feeder layer* en medio de crecimiento de queratinocitos, se mantuvieron durante 72 horas a 37°C . Posteriormente, las células se tripsinizaron y plaquearon en 13 placas de 100 mm junto con 2×10^6 células de *feeder* por placa. Cuando los clones empezaron a ser visibles, se añadió antibiótico G-418 a una concentración de $100 \mu\text{g/mL}$ (Calbiochem). Transcurridos 10 días de selección con antibiótico, se aislaron los clones mediante el sistema de clonaje por anillos y se expandieron en frascos de 25 cm^2 en presencia de G-418 a la concentración indicada. Cuando los queratinocitos alcanzaron el 80-90 % de confluencia, se tripsinizaron y $\frac{1}{2}$ se utilizó para la extracción de ADN genómico y proceder al genotipado por PCR y Southern blot, y el otro $\frac{1}{2}$ se congeló en nitrógeno líquido.

17.4. Genotipado de los clones resistentes a G-418 obtenidos por RH

17.4.1. Genotipado por PCR

Para la detección de la integración específica del casete de selección se realizó una PCR (Expand Long Template PCR system, Roche Diagnostics) en la que se utilizó una pareja de oligonucleótidos (1: 5'-CCTCCTGGACTCCCTGGAAC-3' y 4: 5'-TCTCCTTTAGGTCCGACAG GG-3') diseñados para hibridar en las secuencias adyacentes a la región de homología presente en la construcción de *targeting* (Figura 16). La reacción de PCR se llevó a cabo con el siguiente programa:

- 94°C 1 min
- (94°C 15 s, 58°C 30 s, 68°C 4 min s) x 10 ciclos
- (94°C 15 s, 60°C 40 s, 68°C 4 min) x 25 ciclos (el tiempo de la fase de elongación aumenta 20 s en cada ciclo)
- 68°C 7 min

- 94 °C 3 min

Para el análisis por Southern blot, se digirieron con la enzima HindIII aproximadamente 10

Las sondas fueron obtenidas por PCR. Para la sonda 5' se utilizaron los oligos 5'probeF: 5'-CCCAGCAGGTTCTACCTTG-3' y 5'probeR: 5'-AAGCTTTTCTCCTG CTGGGCCTC-3', y como molde ADN genómico humano. Para la sonda neo se emplearon los oligos 2AF: 5'-GAAGAAAACCCCGGTCCTTTGATTGAAC-3' y NeoR: 5'-GCACTTCGC CCAATAGCA-3', y como molde la construcción de *targeting* AAV-SA-2A-neo.

17.5. Comprobación del transcrito de fusión COL7A1/2A-neo

La presencia del transcrito de fusión COL7A1/2A-neo en los clones recombinantes obtenidos mediante transducción con el vector AAV-SA-2A-neo se verificó mediante RT-PCR utilizando cebadores específicos para el exón 73 del ADNc del gen COL7A1 (oligonucleótido directo COL7A1ex73F: 5'-CAGGAAGGCCAGGAGAGAGG-3') y para el gen de resistencia a la neomicina (oligonucleótido reverso NeoR). El producto de RT-PCR (700 pb) fue verificado por secuenciación.

17.6. Tratamiento de queratinocitos recombinantes con recombinasa Cre

El casete de selección de queratinocitos recombinantes se escindió mediante expresión transitoria de la recombinasa Cre mediada por el vector adenoviral Ad5CMV-Cre-eGFP. Este adenovirus se adquirió de la Universidad de Iowa (Iowa City, IA) y se amplificó y purificó en nuestro laboratorio siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para los Ad-TALENs.

Queratinocitos RDEB-E67A6 procedentes de clones resistentes a G-418 y positivos en el genotipado por PCR y Southern blot, se transdujeron en suspensión con el vector adenoviral Ad5CMV-Cre-eGFP a una MOI de 1×10^3 en presencia de polibreno (8 µg/ml). Un total de 5×10^6 células infectadas se sembraron en un frasco de 75 cm² en medio de crecimiento de queratinocitos suplementado con un 10% de FBS inactivado y se incubaron a 37°C. A las 16 h de la infección se retiró el medio con los virus y se añadió medio fresco. Transcurridas 72 horas de la infección, las células se tripsinizaron y una parte fue destinada para la extracción de ADN genómico y verificar la correcta escisión del casete de selección por PCR y secuenciación, y otra parte se congeló en nitrógeno líquido para estudios posteriores.

18. Extracción de ARN y análisis de expresión por RT-PCR

La extracción de ARN total a partir de cultivos celulares se realizó empleando el kit comercial miRNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH) siguiendo el protocolo especificado por la casa comercial. Una vez cuantificado el ARN total recuperado en un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific), se procedió a la retrotranscripción y síntesis de ADN complementario de cadena simple o ADNc usando el kit SuperScript III First- Strand Synthesis System (Invitrogen).

Para comprobar la correcta síntesis de ADNc, se amplificó mediante PCR parte del ADNc correspondiente al gen GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa). Los oligonucleótidos utilizados fueron: GAPDH F: 5'- ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' y GAPDH R: 5'-TCCACCACCCTG TTGCTGT-3'.

Para el análisis de expresión del gen *COL7A1* tanto de los clones corregidos por recombinación homóloga como por NHEJ, se llevó a cabo una PCR para amplificar un fragmento que abarcara los exones del 73 al 88 del ADNc *COL7A1*. Los oligonucleótidos utilizados fueron: F: 5'-CTGGTCTGGCCCTTGGGGAGAG-3' y R: 5'-CTTCTCTCCCTTTGCTCCAGGG-3'. La PCR se llevó a cabo empleando el siguiente programa:

- 94 °C 3 min.
- (94 °C 45 s, 68 °C 30 s, 72 °C 1 min s) x 5 ciclos (la temperatura de anillamiento disminuye 1°C en cada ciclo)
- (94 °C 45 s, 63 °C 30 s, 72 °C 1 min) x 25 ciclos
- 72 °C 10 min

19. Secuenciación automática

Los plásmidos y productos de PCR se secuenciaron usando el kit comercial de Applied Biosystems Big Dye Terminator V.1.1 Cycle Sequencing. En el caso de los productos de PCR y paso previo a la secuenciación, los oligos y nucleótidos no incorporados a las reacciones de amplificación se eliminaron mediante un tratamiento con Fosfatasa Alcalina y Exonucleasa I (illustra™ ExoStar™ 1-Step; GE Healthcare). Las muestras se procesaron en el secuenciador automático ABI PRISM 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) y se analizaron con el programa Sequencher (Gene Codes, Ann Harbor, MI) y la herramienta web Poly Peak Parser (<http://yosttools.genetics.utah.edu/PolyPeakParser/>).

20. Western blot

Para el análisis de Western blot, queratinocitos a una confluencia del 70-80% se lisaron en tampón de extracción (50 mmol/l Tris-HCl, pH 7,5, 100 mmol/l NaCl, 1% Nonidet P-40, 4 mmol/l EDTA) complementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete Mini, EDTA-free, Roche Diagnostic). Los lisados se incubaron 30 min en hielo y se centrifugaron a 15000xg durante 30 min a 4 °C. La cuantificación de proteína presente en el sobrenadante recogido se realizó mediante el método de Bradford (BioRad, Hercules, CA) usando una curva estándar de rango 1-20 µg de BSA. A continuación, 50 µg de cada muestra se resolvieron en los geles comerciales NuPAGE Novex 3-8% Tris-Acetate Gel 1.0 mm (Invitrogen) mediante electroforesis en condiciones reductoras con tampón MOPS (tampón de 3-morfolino-1-propanosulfonato) y a un voltaje constante de 100V. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Invitrogen) durante 1 h 20 min a 0,40A en un sistema de transferencia húmedo (Criterion Cell and Single-Row AnyGel Stand, Biorad) con un medio de transferencia compuesto por Tris-Base 33 mM, glicina 194 mM y metanol 20%. Una vez transferidas las proteínas, se bloquearon los sitios inespecíficos de la membrana mediante incubación, durante 30 min a temperatura ambiente y en agitación, en una solución de bloqueo preparada con leche en polvo desnatada (5%) diluida en TBS-0,1% Tween20 (TBS: Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, NaCl 137 mM). Posteriormente, se procedió a la incubación de la membrana con el apropiado anticuerpo primario diluido en TBS al 0,5% de leche. Para el análisis de colágeno VII y pRb, las membranas se incubaron con los anticuerpos anti-colágeno tipo VII pAb (Calbiochem) y anti-Rb (G3-

245, BD Pharmingen) respectivamente, ambos a una dilución 1:500. Para la detección de la proteína E7, se utilizó el anticuerpo anti-HPV16E7 (sc-65711, Santa Cruz Biotechnology), dilución 1:200 y para el análisis de expresión de TALENs en células de la línea 293-T transfectadas se empleó el anticuerpo monoclonal anti-HA tag 16B12 (Biolegend) a una dilución 1:1000. Como anticuerpo control de carga se empleó anti- α -tubulina (SigmaAldrich). Este anticuerpo permitió asegurar que la carga de proteínas en cada calle del gel fue constante. Para la detección de la unión del anticuerpo primario se usaron anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa. Para la detección de la señal quimioluminiscente se utilizó el kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific). Tras la exposición de la membrana a una película fotográfica (Amersham), esta última se reveló en una reveladora automática (Curix60, AGFA).

21. Generación de equivalentes dermo-epidérmicos y trasplante a ratones inmunodeficientes

21.1.- Preparación de equivalentes cutáneos

La preparación de equivalentes dermo-epidérmicos por bioingeniería se basó en el uso de una matriz dérmica rica en fibrina (Meana, Iglesias et al. 1998) empleando, como fuente de ésta, el fibrinógeno procedente del crioprecipitado de plasma de cerdo. Para obtener el crioprecipitado, el plasma se sometió a 3 ciclos de congelación-descongelación y tras centrifugar a 3500 rpm durante 15 minutos a 4°C y desechar el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en NaCl al 0.9% y se incubó a 37°C para disolver completamente el fibrinógeno.

Para generar el componente dérmico, se resuspendieron 2×10^5 fibroblastos de paciente EBDR en 5 mL de DMEM-10% FBS junto con 1,5 mL de la solución de fibrinógeno (crioprecipitado). Tras añadir 0,5 ml de CaCl_2 0,025 mM conteniendo 5,5 UI de trombina bovina (Sigma), la mezcla se repartió inmediatamente en 2 pocillos de 35 mm (3,5 mL por pocillo) y se incubó a 37 °C hasta su coagulación. Una vez solidificado, se añadió sobre el gel medio de siembra de queratinocitos y se mantuvo a 37 °C durante, al menos, 12 horas.

Para el componente epidérmico, $2,5 \times 10^5$ queratinocitos/gel fueron sembrados sobre la matriz de fibrina en medio de crecimiento de queratinocitos y en ausencia de *feeder* y cultivados hasta alcanzar la confluencia. En ese momento, los equivalentes cutáneos fueron separados manualmente de la superficie de la placa de cultivo y trasplantados a ratones inmunodeficientes (Figura 17).

21.2.- Trasplante a ratones inmunodeficientes

Los equivalentes cutáneos se trasplantaron ortotópicamente en el lomo de hembras de ratón desnudo de 6 semanas de edad (fondo genético NMRI-Foxn1^{nu}/Foxn1^{nu} RjOrl, Janvier Labs) siguiendo el procedimiento descrito por nuestro laboratorio en Del Rio *et al.*, 2002. Brevemente, se realizó una herida circular en el lomo del animal del mismo tamaño que el equivalente cutáneo y la piel retirada se desvitalizó mediante tres ciclos de congelación en nitrógeno líquido/descongelación a 37 °C. A continuación, se trasplantó el equivalente cutáneo sobre la herida generada y se cubrió con la piel desvitalizada. Esta piel, que actúa como apósito biológico, se fijó

a los bordes de la herida mediante sutura. Para el trasplante subcutáneo, se procedió según el método descrito en Barrandon *et al.*, 1988.

Al cabo de 5-12 semanas en el caso de los trasplantes ortotópicos, o a las 2-3 semanas en el caso de los subcutáneos, los ratones fueron sacrificados y se extrajeron los injertos para su procesamiento histológico.

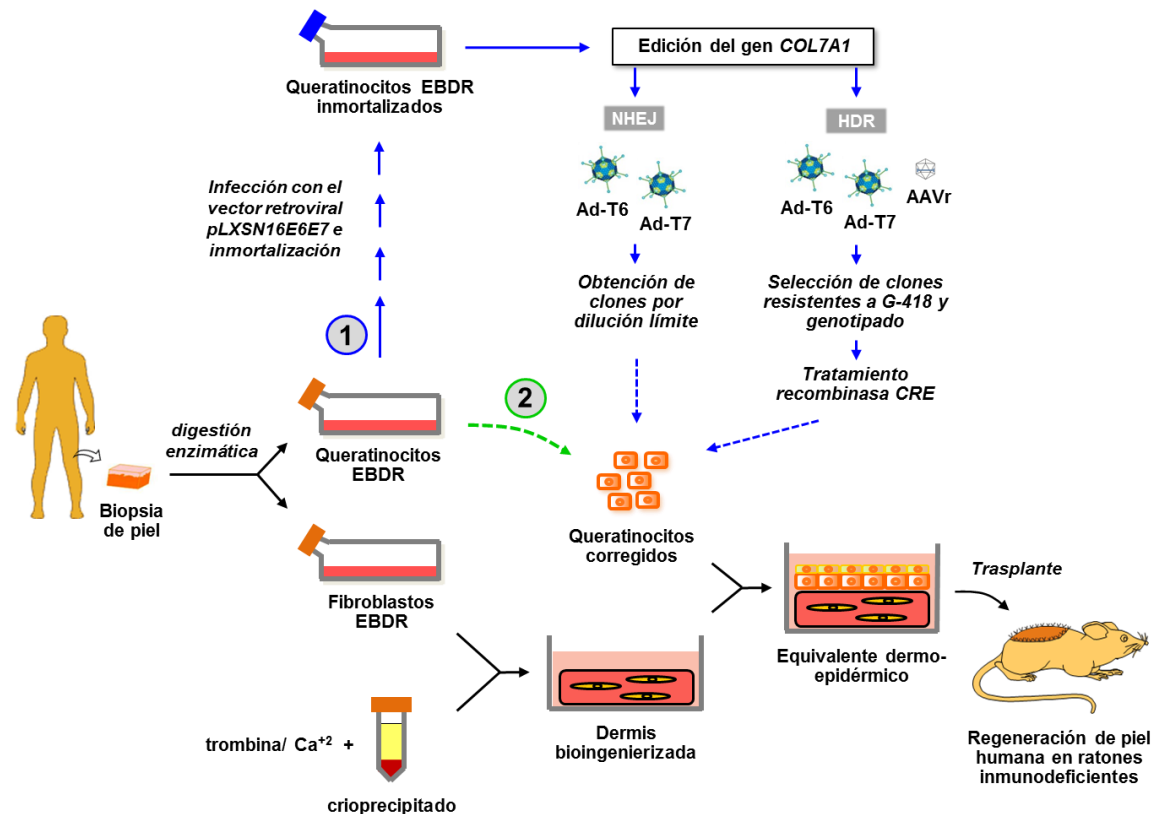


Figura 17. Diagrama explicativo del proceso de regeneración de piel humana en ratones inmunodeficientes a partir de clones de queratinocitos de paciente EBDR inmortalizados y corregidos por técnicas de edición génica (1), y a partir de clones de células madre epidérmicas EBDR editados (2).

22. Procesamiento de los injertos cutáneos

Los injertos cutáneos extraídos a las 2-3 semanas post-trasplante (trasplante subcutáneo) o a las 5-12 semanas (trasplante ortotópico) se procesaron de dos formas diferentes dependiendo del análisis a realizar a posteriori en los cortes histológicos. Las biopsias fueron fijadas en formaldehído al 4% en PBS durante al menos 24 h e incluidas en parafina para la realización de posteriores técnicas histológicas (tinción con H&E) y de inmunohistoquímica o bien, embebidas en Tissue-Tek O.C.T.TM Compound (Sakura Finetek) para la realización de análisis de inmunofluorescencia.

Los bloques de parafina se seccionaron con un microtomo (RM 2255, Leica) obteniéndose cortes seriados de 5 µm de grosor mientras que las muestras de congelación se seccionaron en un criostato (CM1850UV, Leica) en criocortes de 8-10 µm.

23. Inmunofluorescencia e inmunohistoquímica

La expresión de colágeno VII y de las queratinas K1, K5 y K10, así como la detección de las nucleasas TALEN en queratinocitos transducidos con los vectores adenovirales se llevó a cabo por inmunofluorescencia tras el cultivo *in vitro* de las correspondientes células en portas estériles (chamber slide system, Nunc Lab-Tek™). Una vez alcanzada la confluencia, las células se fijaron con metanol/ acetona (1:1) 10 min a -20 °C. Para la detección de las TALENs la fijación se realizó con paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich) y posterior incubación con TritónX100 al 1% (Sigma Aldrich) durante 10 min para la permeabilización de la membrana. Independientemente del tipo de fijación realizado, las muestras se lavaron 3 veces con PBS y se procedió, seguidamente, a la incubación en PBS al 3% de BSA durante 30 min para el bloqueo de los sitios inespecíficos. A continuación, las células se incubaron durante 1 h y a temperatura ambiente con el correspondiente anticuerpo primario diluido en tampón de bloqueo. Los anticuerpos primarios empleados fueron: anti-queratina 1 (dilución 1:500, Covance), anti-queratina 5 (dilución 1:1000, Covance), anti-queratina 10 (dilución 1:50, Santa Cruz Biotechnology), anti-HA tag (dilución 1:1000, clon 16B12 Biolegend). Tras la realización de 3 lavados de 5 min con PBS, se procedió a la incubación en tampón de bloqueo con el correspondiente anticuerpo secundario: AlexaFluor594 (A11005, Molecular Probes) a una dilución 1:1000 para la detección de K1, AlexaFluor488 (A11008, Molecular Probes) a una dilución 1:1000 para la detección de K10 y el anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado con el fluorocromo TexasRed (711-075-152, Jackson Immunoresearch laboratories) para la detección de HA. Después de 3 lavados de 5 min con PBS, el ADN nuclear de las células fijadas se tiñó con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) (Roche) 20 µg/mL y se procedió al montaje de los portas con moviol (Hoechst). Las fotos adquiridas con el microscopio epifluorescente Zeiss Axioplan2 (equipado con una cámara AxioCam MRm) fueron procesadas con el programa AxioVision 4.6.3 (Carl Zeiss).

El análisis de la expresión de colágeno VII en criocortes de 7 µm de grosor de pieles regeneradas se realizó, asimismo, por inmunofluorescencia. Para ello, una vez fijados los cortes con acetona fría durante 10 min a -20 °C, se incubaron con el anticuerpo policlonal anti- colágeno VII (Calbiochem). El anticuerpo anti-colágeno VII monoclonal LH7.2 (Chemicon) se empleó en el caso de criocortes procedentes de trasplantes ortotópicos.

El análisis inmunohistoquímico para el estudio de la expresión de involucrina (marcador de diferenciación terminal de los queratinocitos) se llevó a cabo en cortes previamente desparafinados. Las uniones inespecíficas se bloquearon incubando las muestras durante 30 min a temperatura ambiente con suero de caballo al 5% en PBS-Tween20 0,05% y, a continuación se procedió a la incubación de los cortes durante 1 h a 37 °C o durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario monoclonal anti-involucrina humana (clon SY5, Sigma) diluido 1:100 en PBS-BSA 0,05%. El anticuerpo secundario biotinilado (Jackson ImmunoResearch) se incubó a una dilución 1:4000 durante 45 min a temperatura ambiente y el exceso se eliminó mediante 3 lavados con PBS-Tween20 al 0,05%. La detección del marcaje se realizó mediante el sistema avidina/estreptavidina-peroxidasa utilizando el Kit ABC (*Avidin-Biotin Complex*, Vectastain, Vector Laboratories). Tras incubación de las muestras con el complejo ABC durante una hora, se procedió a la detección de la actividad

peroxidasa añadiendo DAB (diaminocencidina) (Vector Laboratories) como sustrato cromogénico de la peroxidasa, así como peróxido de hidrógeno como catalizador de la reacción. La intensidad de la tinción se controló por microscopía óptica. Finalmente, una vez parada la reacción química con agua, las muestras se contratiñeron con hematoxilina/eosina.

La expresión de GFP se analizó en cortes previamente desparafinados y en cortes en congelación por inmunohistoquímica o por inmunofluorescencia, respectivamente, siguiendo los procedimientos descritos para estas técnicas y usando como anticuerpo primario el anticuerpo policlonal anti-GFP (ab290, Abcam).

IV. RESULTADOS

1. ESTABLECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR INMORTALIZADA GENERADA A PARTIR DE QUERATINOCITOS DE PACIENTE EBDR

A pesar de que el cultivo de clones de queratinocitos humanos es una técnica factible en laboratorios con experiencia (Barrandon y Green, 1987; Larcher *et al.*, 2007; Mathor *et al.*, 1996), su uso para probar la eficacia de procedimientos de terapia génica clonal, que requieren el aislamiento y caracterización de un gran número de clones, suponen un reto difícilmente superable. Por ello, es muy recomendable el empleo de modelos celulares más manejables, capaces de sustituir a los queratinocitos primarios de paciente, y en los que poder ensayar distintos protocolos de corrección génica *ex vivo*. Por este motivo y teniendo en cuenta la elevada prevalencia de la mutación c.6527insC en el gen *COL7A1* en la población de pacientes españoles diagnosticados de EBDR, se decidió generar una línea celular en la que poder desarrollar estrategias de terapia génica bioseguras diseñadas específicamente para la corrección de esta mutación.

En la primera parte de este trabajo se describen, detalladamente, los diferentes experimentos llevados a cabo para generar y valorar la línea immortalizada como posible modelo celular. Se caracterizó, como se verá a continuación, su capacidad proliferativa y de diferenciación, clonogenicidad, perfil citogenético, así como su potencial de regeneración cutánea y de recapitulación *in vivo* del fenotipo ampolloso característico de la EBDR.

1.1. Inmortalización de queratinocitos primarios y derivación de la línea RDEB-E67A6.

Basándonos en trabajos previos donde se describen diferentes métodos de inmortalización de queratinocitos humanos, incluyendo los derivados de pacientes con genodermatosis (Chamcheu *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2002; Halbert *et al.*, 1991; Mecklenbeck *et al.*, 2002; Morley *et al.*, 2003), nos decantamos por la expresión de las proteínas E6 y E7 del virus del papiloma humano HPV-16 para establecer una línea celular a partir de queratinocitos de paciente con EBDR. El acceso a células de pacientes diagnosticados a nivel molecular por nuestro grupo de Medicina Regenerativa, nos permitió disponer de queratinocitos primarios de un paciente con la mutación de alta prevalencia (c.6527insC) en homocigosis (paciente número 4 descrito en Escamez *et al.*, 2010).

Así pues, queratinocitos primarios procedentes de este paciente, se infectaron con el vector retroviral pLXSN16E6E7 que codifica las proteínas E6 y E7 del virus del papiloma humano tipo 16 (HPV-16). Las células transducidas se cultivaron en condiciones de crecimiento de queratinocitos humanos primarios con *feeder layer* y se realizaron pases sucesivos a un ratio 1:5. En el pase 5, los queratinocitos fueron capaces de crecer en ausencia de *feeder layer* sin mostrar signos aparentes de crisis proliferativa y mostrando, en todo momento, una morfología típica de queratinocitos humanos (Figura 18b). Aunque esta población parental policlonal (denominada RDEB-E67) fue sometida en estas condiciones a más de 48 pases, fue en el pase 24, cuando se decidió derivar clones por dilución límite. De los clones aislados, sólo uno de ellos (denominado RDEB-E67A6) fue seleccionado para estudios posteriores por su rápido crecimiento y apariencia morfológica en cultivo *in vitro* (Figura 18c).

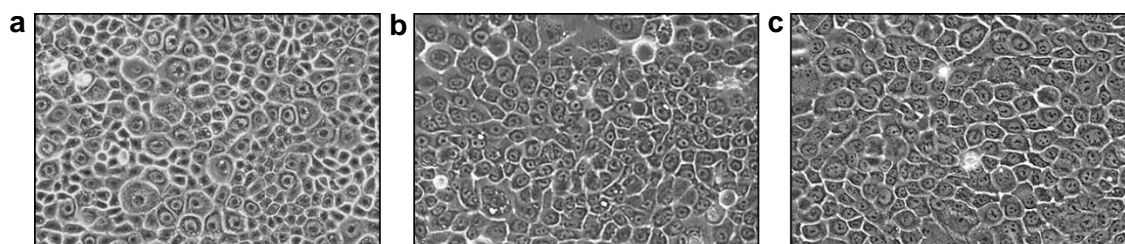


Figura 18. Características fenotípicas de queratinocitos EBDR immortalizados con las proteínas E6/E7 del HPV-16. a) Apariencia morfológica de queratinocitos primarios de paciente EBDR en cultivo *in vitro*. b) y c), imágenes de queratinocitos en cultivo *in vitro* de la población immortalizada parental RDEB-E67 en su pase 30 y del clon RDEB-E67A6, respectivamente.

1.2. Caracterización de la línea celular immortalizada RDEB-E67A6

1.2.1. Comprobación de la expresión de la proteína E7

La expresión de la proteína de immortalización E7 así como la degradación de la proteína retinoblastoma mediada por ella, fueron verificadas mediante análisis de Western blot (Figura 19).

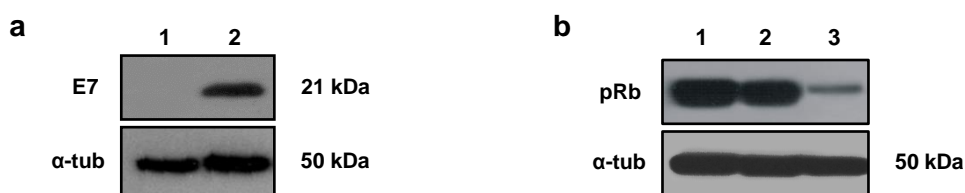


Figura 19. a) Análisis por Western blot de la expresión de la proteína de immortalización E7 (HPV-16) en queratinocitos EBDR no transducidos (carril 1) y en el clon RDEB-E67A6 (carril 2). b) Análisis de la expresión de la proteína retinoblastoma (pRb). El análisis por Western blot muestra una marcada reducción de la expresión en la línea immortalizada (carril 3) en comparación con queratinocitos normales (carril 1) o de paciente EBDR (carril 2).

1.2.2. Persistencia de la mutación c.6527insC del gen COL7A1 de la línea RDEB-E67A6

Para poder testar en la línea generada diferentes procedimientos de edición génica enfocados a la corrección de la mutación c.6527insC era esencial, en primer lugar, verificar la presencia de dicha mutación en homocigosis.

Para ello, se llevó a cabo un análisis de RFLP (Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción, RFLP, del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*). La digestión con BglI previa amplificación de la región comprendida entre los exones 79 y 85 del gen COL7A1 originó un patrón de bandas diferente dependiendo de la presencia (alelo silvestre) o ausencia (alelo mutado) de la diana para dicha enzima de restricción (Figura 20a). La desaparición de las bandas de 623 pb y 481 pb junto al mantenimiento de la banda de 1105 pb que se observó en los carriles correspondientes a los queratinocitos primarios de paciente y de la línea RDEB-E67A6 fue indicativo de la presencia de la mutación c.6527insC en homocigosis (Figura 20b). Los resultados obtenidos por RFLP se verificaron por secuenciación del exón 80 (Figura 20c) y fueron consistentes con la ausencia de expresión de colágeno VII

observada por Western blot (Figura 20d). Por tanto, el proceso de immortalización al que fueron sometidos los queratinocitos no indujo cambios genómicos que afectaran al sitio de mutación del gen *COL7A1*.

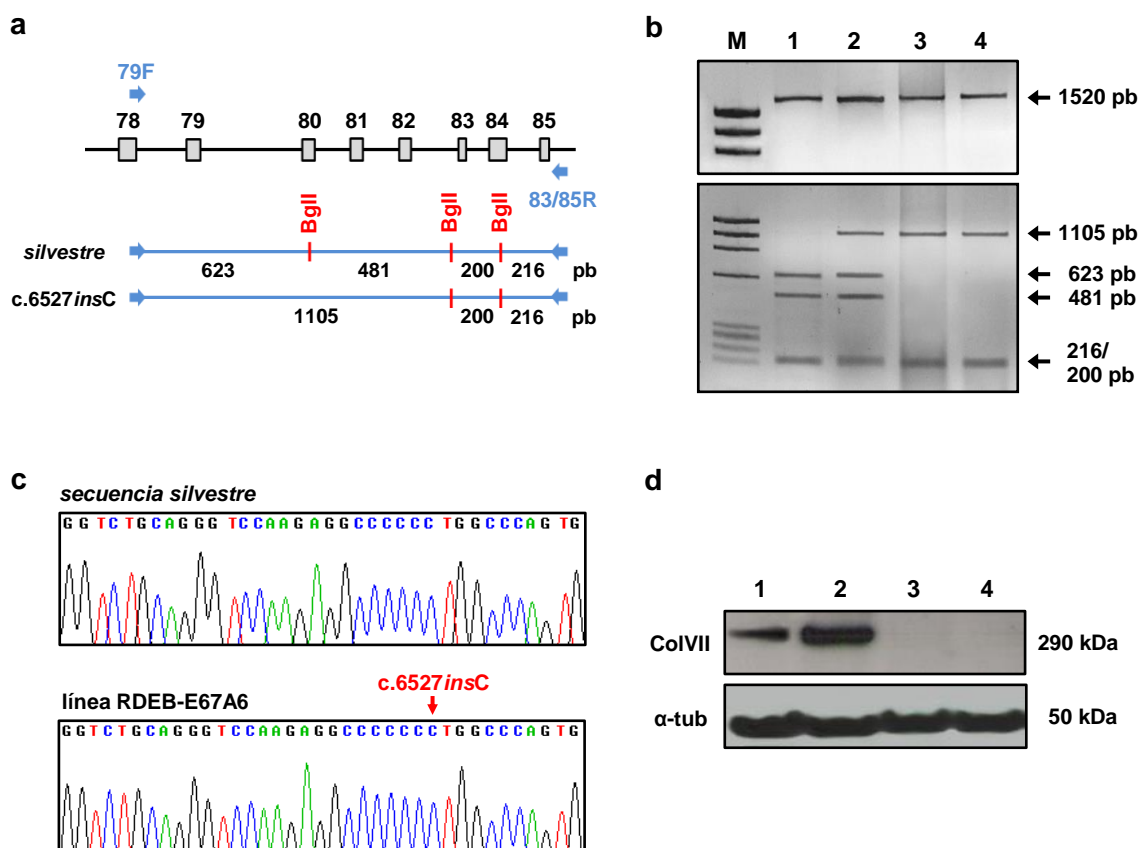


Figura 20. Mantenimiento de la mutación patológica *c.6527insC* en el exón 80 del gen *COL7A1* en la línea immortalizada RDEB-E67A6. **a)** La amplificación por PCR del segmento de ADN genómico comprendido entre los exones 79 y 85 del gen *COL7A1* dio lugar a una banda de 1520 pb que tras digestión con *BglII* originó fragmentos de diferente tamaño dependiendo de la presencia (alelo mutado) o ausencia (alelo silvestre) de la mutación *c.6527insC*. **b)** Imágenes de los geles de agarosa obtenidos en el análisis por RFLP de la mutación *c.6527insC*. Carril 1: queratinocitos humanos normales. Carril 2: queratinocitos heterocigotos para la mutación *c.6527insC*. Carril 3: queratinocitos primarios de un paciente EBDR homocigoto para la mutación *c.6527insC*. Carril 4: línea RDEB-E67A6. **c)** Cromatogramas que muestran la secuencia del exón 80 del gen *COL7A1* en queratinocitos normales (secuencia silvestre) y de la línea RDEB-E67A6 donde se aprecia la inserción, en ambos alelos, de un nucleótido de citosina (flecha roja) en la posición 6527 de la secuencia codificante. **d)** Análisis de la expresión de colágeno VII por Western blot. Se aprecia la ausencia total de proteína en queratinocitos EBDR (carril 3) y de la línea RDEB-E67A6 (carril 4) en comparación con queratinocitos heterocigotos (carril 1) y queratinocitos primarios normales (carril 2). Como control de carga se analizó la expresión de α -tubulina.

1.2.3. Análisis de la capacidad proliferativa y clonogenicidad *in vitro*

Para analizar la capacidad proliferativa de la línea respecto a la población parental de la cual deriva, se llevó a cabo un ensayo de proliferación celular *in vitro*. Las curvas de crecimiento obtenidas al representar el número de células contabilizadas frente al tiempo de crecimiento en cultivo (Figura 21a) se ajustaban a un crecimiento de tipo exponencial con tiempos de duplicación de la población de 20 h y 15 min para RDEB-E67 y de 18 h y 27 min para el clon RDEB-E67A6.

A pesar de la elevada capacidad proliferativa mostrada por ambas poblaciones, cuando éstas eran crecidas a baja densidad originaban un número reducido de colonias pequeñas y aberrantes (Figura 20b). Sin embargo, este inconveniente pudo solventarse fácilmente sembrando las células en presencia de *feeder layer*. En estas condiciones se desarrollaron colonias robustas y vigorosas (Figura 20b) y se pudo determinar sus correspondientes potenciales clonogénicos mediante el ensayo de formación de colonias. Este análisis reveló, tras tinción de las células con rodamina B (Figura 21c), una eficiencia de formación de colonias (CFE) prácticamente idéntica en ambas poblaciones ($18,7 \pm 1,4\%$ para RDEB-E67 y $18,3 \pm 1,5\%$ RDEB-E67A6) (Figura 21d). Estos valores se encuentran en el rango de los obtenidos con queratinocitos primarios humanos altamente clonogénicos bajo similares condiciones experimentales (Barbaro *et al.*, 2007).

Relevantemente, en ningún momento durante el desarrollo del experimento se apreció la formación de focos de diferenciación terminal. Estos focos aparecen cuando los queratinocitos pierden la adhesión al sustrato de cultivo al igual que los queratinocitos *in vivo* pierden el contacto con la membrana basal como consecuencia del inicio del proceso de diferenciación epidérmica.

En conjunto, los resultados obtenidos en los experimentos de proliferación celular y de formación de colonias demostraron la elevada capacidad proliferativa y alta clonogenicidad de la línea RDEB-E67A6. Además, los complejos requerimientos de crecimiento y de nicho que mantenían estas células, mostrados por su escasa capacidad para crecer a baja densidad en ausencia de *feeder* y la necesidad de medio específico de queratinocitos sugirieron que la expresión de las proteínas E6 y E7 conduce a un fenotipo inmortalizado pero cercano al estado fisiológico.

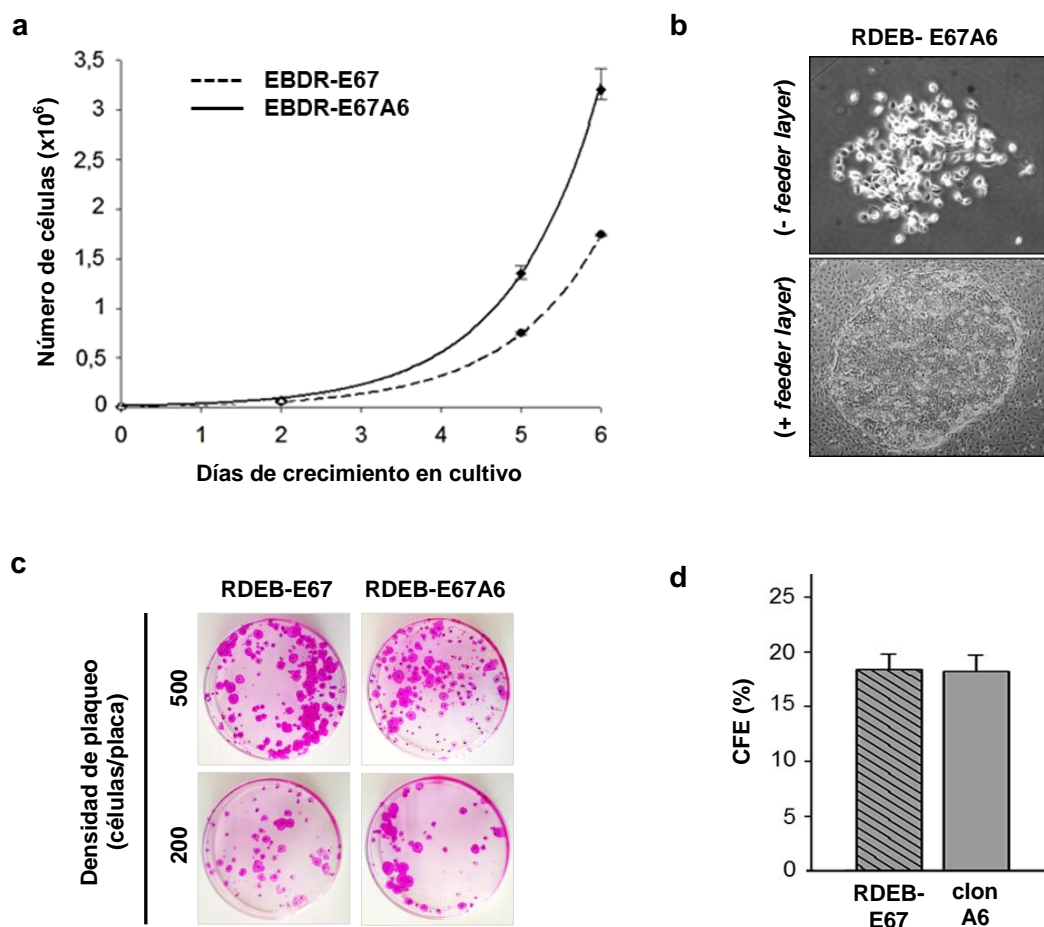


Figura 21. Características proliferativas de la población parental RDEB-E67 y del clon A6 obtenido a partir de ella. a) Curvas de crecimiento de ambas poblaciones. El número de células se determinó a los 2, 5 y 6 días tras la siembra de 1×10^4 células. Las curvas indican un crecimiento de tipo exponencial con una fuerte predominancia de células en división. b) Imágenes representativas de una colonia de la línea RDEB-E67A6 crecida en presencia y ausencia de *feeder layer*. c) Imágenes macroscópicas representativas de las colonias fijadas y teñidas con rodamina B. d) Cuantificación de la eficiencia de formación de colonias (CFE) de las dos poblaciones de estudio.

1.2.4. Análisis de la capacidad de diferenciación *in vitro*

La capacidad de la línea inmortalizada para diferenciar *in vitro* se evaluó mediante el análisis de la expresión de las queratinas K1 y K10 tras un aumento de la concentración de iones Ca^{+2} en el medio de crecimiento (Hennings *et al.*, 1980). Tras cuatro días de la adición al medio de cultivo del estímulo diferenciador (concentración de calcio 1,5 mM), el número de células positivas K1/K10 tanto en las poblaciones RDEB-E67 y RDEB-E67A6 como en los queratinocitos primarios humanos normales fue similar (Figura 22). El número aparentemente bajo de queratinocitos primarios que expresaban K1/K10 se debió, probablemente, al hecho de que el número total de células apenas aumentó durante los cuatro días de incubación, ya que la detención del crecimiento inducida por calcio ocurre muy rápidamente en este tipo celular (Stanley y Yuspa, 1983). Sin embargo, las poblaciones inmortalizadas fueron capaces de diferenciar sin una pérdida concomitante de la capacidad proliferativa como se pudo comprobar al observar la densidad de los núcleos tras cuatro días de crecimiento en medio de cultivo con

alto calcio. Estos resultados indicaron que, tanto la población parental RDEB-E67 como el clon RDEB-E67A6, estaban dotadas de una elevada capacidad proliferativa sin perder, por ello, su capacidad de diferenciación.

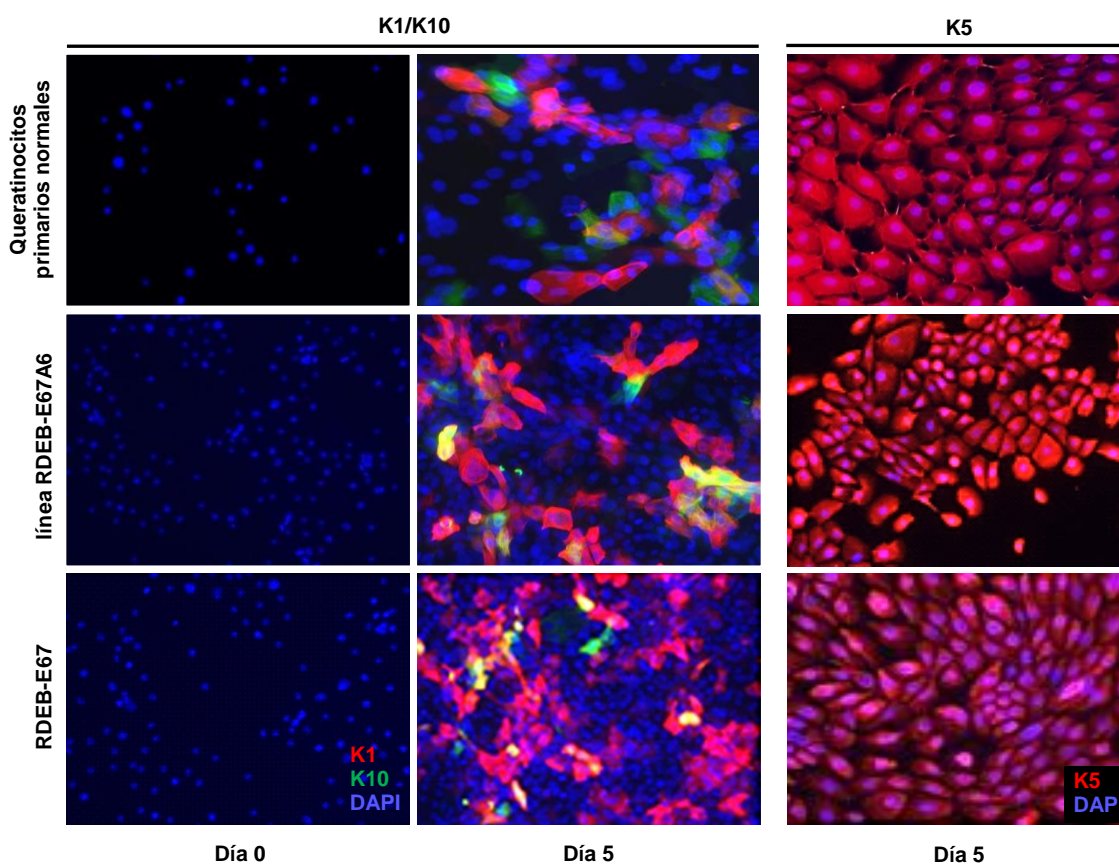


Figura 22. Análisis mediante inmunofluorescencia de la expresión de marcadores de diferenciación tempranos: queratinas K1 (en rojo) y K10 (en verde), ante un estímulo de alta concentración de Ca^{2+} en el medio de cultivo. La expresión constitutiva de la queratina K5 es indicativa de la naturaleza epidérmica de las células. En azul se muestran los núcleos celulares mediante tinción con DAPI.

1.2.5. Estudio citogenético

Debido a que la immortalización inducida por las proteínas E6 y E7 del HPV-16 va acompañada de cierto grado de inestabilidad genética (Duensing *et al.*, 2000), se realizó un análisis espectral de los cariotipos (SKY) tanto de la población clonal RDEB-E67A6 como policlonal RDEB-E67 para identificar las previsibles alteraciones cromosómicas, tanto numéricas como estructurales, producidas durante el proceso de immortalización. Además, aunque una población celular muestre un aspecto homogéneo puede mantener, sin embargo, diferencias genéticas distribuidas en distintos clones que es importante determinar.

El análisis de SKY de la población parental policlonal reveló la existencia de tan sólo dos poblaciones con alteraciones clonales. Una de ellas presentaba ganancia de dos copias extra del cromosoma 20 (48, XY, +20x2) y la otra, diploide, una alteración estructural que implicaba al cromosoma 14 y 20 (46, XY, der20 t(14;20)) (Figura 23a y b). Como el análisis citogenético posterior del clon RDEB-E67A6 mostró, como alteración numérica, la presencia de manera

clonal de dos copias extra del cromosoma 20, se dedujo que el clon se obtuvo a partir de la población tetrasómica (Figura 23c). La amplificación de secuencias del cromosoma 20 ha sido descrita en otras células inmortalizadas con la proteína E7 (Cuthill *et al.*, 1999).

Es importante recordar que el gen *COL7A1* se localiza en el cromosoma 3. En el análisis citogenético no se observó ninguna alteración estructural que implicara a este cromosoma.

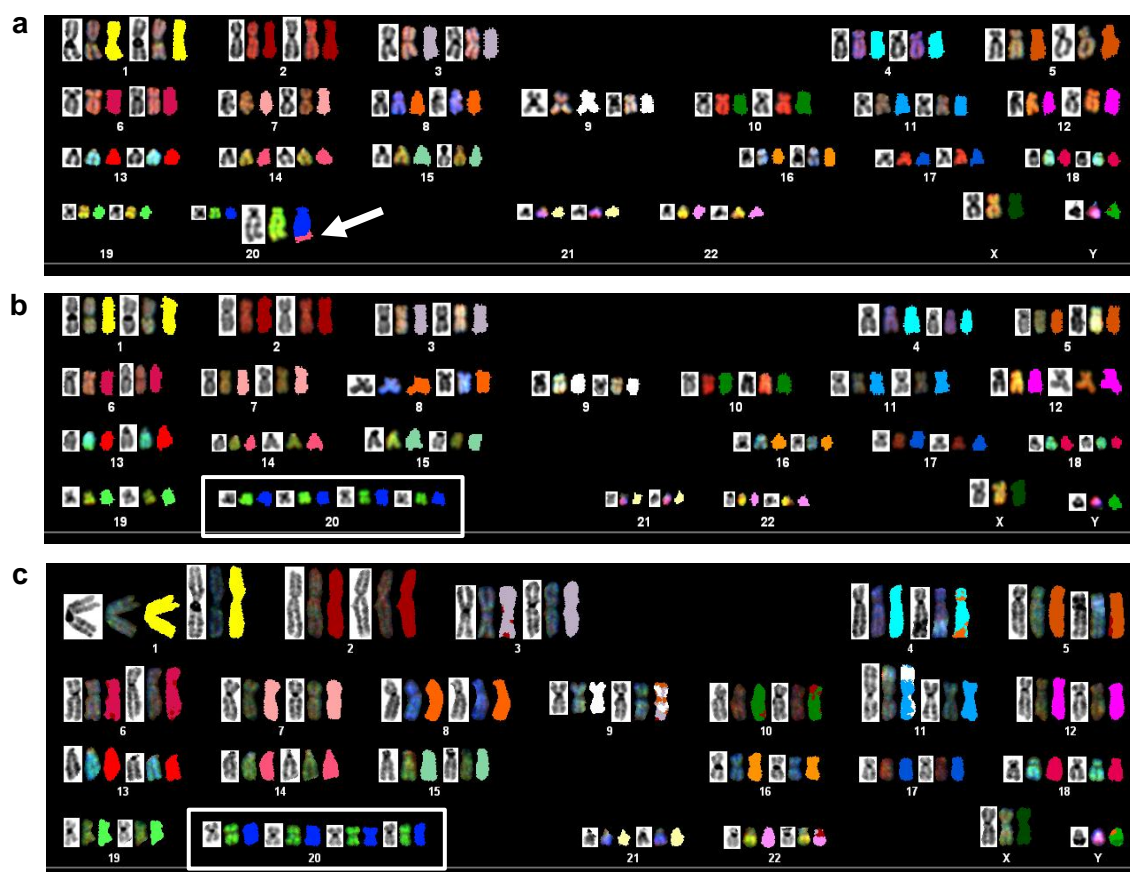


Figura 23. Análisis citogenético mediante SKY. a) y b) Cariotipo espectral multicolor de las dos poblaciones presentes en la población parental RDEB-E67 cuyas fórmulas cromosómicas son (a) 46, XY, der20 t(14;20) (translocación indicada con flecha blanca) y (b) 48, XY, +20x2. c) Cariotipo espectral multicolor de una de las 15 metafases analizadas en el clon RDEB-E67A6. La tetrasomía del cromosoma 20 se muestra recuadrada en blanco.

El reducido número de alteraciones citogenéticas encontradas en la línea es compatible con el bajo grado de autonomía exhibido en el ensayo de clonogenicidad bajo condiciones de aislamiento extremo.

Además, como se mostrará en el siguiente apartado, estas alteraciones no parecen estar asociadas con una conversión maligna de las células.

1.2.6. Evaluación del potencial tumorigénico

Antes de caracterizar el comportamiento *in vivo* de la línea inmortalizada, se decidió descartar posibles propiedades tumorigénicas. El posible potencial tumorigénico se evaluó mediante inoculación subcutánea de queratinocitos RDEB-E67A6 en los flancos de ratones inmunodeficientes (ver apartado 8 de Materiales y Métodos). A pesar de la elevada capacidad proliferativa que mostró la línea en los ensayos de proliferación *in vitro*, no se detectaron tumores en las zonas de inyección en los 6 meses de duración del experimento tratándose, por tanto, de una línea no tumorigénica (Figura 24a). Por el contrario, los dos ratones que recibieron inyecciones de células de la línea A431 como control positivo de tumorigénesis desarrollaron tumores bastante notables en ambos flancos (Figura 24b). Estos ratones tuvieron que ser sacrificados a las 6 semanas de la inoculación.

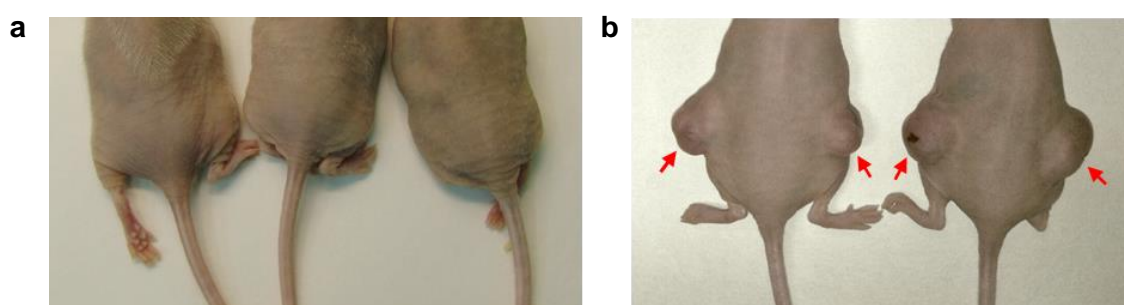


Figura 24. Ensayo de tumorigenicidad. a) Imagen de los ratones a los 6 meses de la inoculación de células de la línea RDEB-E67A6. No se apreció la presencia de tumores en ningún flanco durante todo el periodo de observación. b) Imagen de los ratones a las 6 semanas de la inyección de células de la línea A431. Nótese el desarrollo de carcinomas epidermoides en las zonas de inoculación (flechas rojas).

1.2.7. Potencial regenerativo y características fenotípicas *in vivo*

La capacidad de la línea inmortalizada para regenerar piel y reproducir *in vivo* el fenotipo ampollado de la EBDR se evaluó mediante trasplante, a ratones inmunodeficientes *nu/nu*, de equivalentes cutáneos generados a partir de queratinocitos de la línea RDEB-E67A6 y fibroblastos humanos de paciente EBDR. Los equivalentes dermo-epidérmicos bioingenierizados se trasplantaron de forma subcutánea siguiendo la técnica descrita por Barrandon y colaboradores (Barrandon *et al.*, 1988). Entre las 2 y 3 semanas post-trasplante, los injertos cutáneos se extrajeron y se analizaron histológicamente (Figura 25a). En primer lugar, se comprobó el origen del componente epidérmico de la piel regenerada mediante el análisis de la expresión de involucrina humana. La tinción con este marcador de diferenciación terminal específico de especie permitió verificar el origen humano de las biopsias (Figura 25b), lo que demostró la capacidad de las células de la línea para regenerar piel humana. Posteriormente, las tinciones realizadas con hematoxilina/eosina (H&E) para estudiar a fondo la arquitectura de la piel desarrollada, mostraron la existencia de una epidermis bien diferenciada y estratificada, con una maduración gradual, y la presencia de un estrato granuloso bien desarrollado y un estrato córneo con una moderada paraqueratosis, pero sin signos neoplásicos detectables (Figura 25c). El análisis de la expresión de colágeno VII por

inmunofluorescencia reveló, como era previsible, una ausencia total de proteína en las pieles regeneradas a partir de queratinocitos de la línea (Figura 25d) así como la separación entre dermis y epidermis característica del fenotipo EBDR (asterisco en Figura 25d).

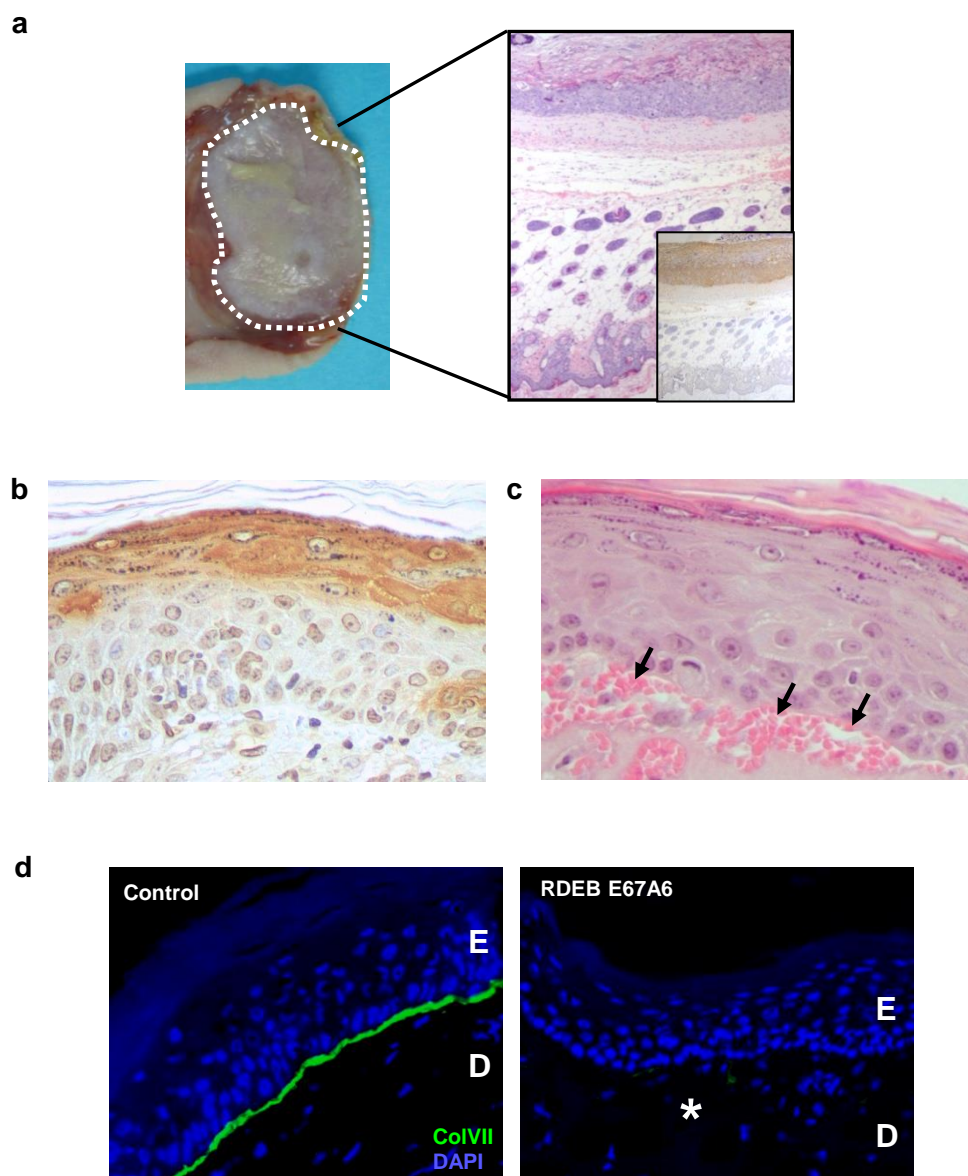


Figura 25. Análisis histológico y estudio de la expresión de colágeno VII en piel regenerada a partir de queratinocitos RDEB-E67A6. a) La regeneración de piel tras el trasplante intradérmico de los equivalentes cutáneos en el lomo de ratones inmunodeficientes fue monitorizada a través del desarrollo de un tejido blanquecino (indicado en la imagen por una línea blanca discontinua). b) La tinción de inmunoperoxidasa con un anticuerpo específico anti-involucrinas humanas demostró el origen humano del tejido analizado. La expresión de este marcador de diferenciación terminal, restringida a las capas espinosa y granular, recapituló el programa de diferenciación característica de la piel humana. c) El análisis por H&E en un corte consecutivo al empleado para la tinción con involucrina, mostró la formación de un epitelio bien estratificado sin signos de displasia. La zona hemorrágica (flechas) permitió apreciar la presencia de ampollas entre la epidermis (E) y la dermis (D), signo patognomónico de la EBDR. d) Análisis por inmunofluorescencia de la expresión de colágeno VII en trasplantes de equivalentes cutáneos generados a partir de queratinocitos humanos normales (izquierda) y de queratinocitos de la línea RDEB-E67A6 (derecha). La ausencia de colágeno VII y la presencia de ampolla en la zona dermo-epidérmica se indican con un asterisco.

El comportamiento prácticamente normal de la línea inmortalizada en trasplantes subcutáneos nos llevó a analizar también su comportamiento en trasplantes de larga duración (ortotópicos) (Del Rio *et al.*, 2002; Llamas *et al.*, 2004). Para facilitar el seguimiento e identificación del trasplante en el animal receptor, previamente a la generación de los equivalentes dermo-epidérmicos se marcaron los queratinocitos con GFP mediante transducción con un vector lentiviral. Al cabo de 5-6 semanas post-trasplante (Figura 26a y b), se procesaron los injertos cutáneos y se analizaron las características histológicas de la piel regenerada. La tinción con H&E mostró una correcta estratificación apreciándose, claramente, los estratos basal, espinoso, granuloso y córneo (Figura 26c). La inmunohistoquímica para la detección del marcador GFP permitió distinguir, inequívocamente, la presencia de queratinocitos de la línea en la epidermis regenerada, confirmándose el origen humano de la piel analizada (Figura 26d). Hay que destacar que la piel regenerada a partir de queratinocitos de la línea era morfológicamente muy similar a la obtenida con queratinocitos humanos normales. Debido a que las biopsias cutáneas fueron cuidadosamente diseccionadas para facilitar el procesamiento histológico, y el estrés mecánico evitado en todo lo posible, la formación de ampolla no fue evidente. Sin embargo, la inmunofluorescencia de colágeno VII permitió comprobar la ausencia de expresión de proteína (Figura 26e).

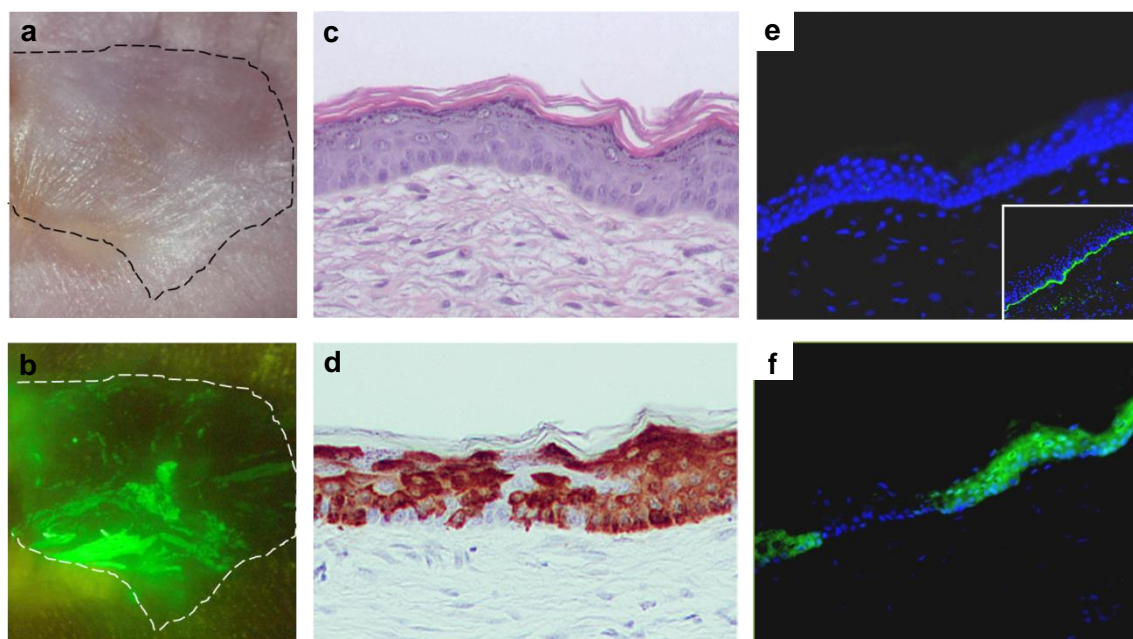


Figura 26. Regeneración cutánea tras el trasplante ortotópico a ratones inmunodeficientes de equivalentes bioingenierizados conteniendo queratinocitos de la línea RDEB-E67A6 GFP+. a) y b) Apariencia macroscópica de la piel regenerada en el lomo de ratones inmunodeficientes (5 semanas post-trasplante). a) Visualización del trasplante bajo luz blanca (línea discontinua negra) y b) bajo luz azul (línea discontinua blanca). c) Análisis histológico mediante tinción con H&E. d) Tinción de inmunoperoxidasa para GFP en un corte consecutivo al mostrado en (c). e) Análisis por inmunofluorescencia de la expresión de colágeno VII. Se muestra la ausencia de expresión en pieles regeneradas a partir de células RDEB-E67A6 en comparación con las regeneradas a partir de queratinocitos humanos normales (inserto esquina inferior derecha). Análisis por inmunofluorescencia de la expresión de EGFP en un corte consecutivo al mostrado en (e). La detección mediante inmunofluorescencia de EGFP fue necesaria ya que la fluorescencia de esta proteína se pierde tras la fijación en metanol-acetona (fijación empleada en secciones congeladas para estudios de expresión de colágeno VII). (a, b) 6x. (c, d) 200x. (e, f) 100x.

1.2.8. Comprobación de la preservación de la capacidad de síntesis de colágeno VII de la línea inmortalizada RDEB-E67A6 mediante transducción con un vector retroviral portador del ADNc del gen *COL7A1*

Para ensayar en un modelo celular distintas estrategias de terapia génica destinadas a la corrección del fenotipo de la EBD, es fundamental que dicho modelo mantenga la capacidad de sintetizar y secretar colágeno VII. Aunque, como se ha mostrado en el anterior apartado, la línea inmortalizada establecida presentaba unas propiedades regenerativas y de diferenciación que permitían recapitular el fenotipo de la enfermedad *in vivo*, era necesario comprobar si el proceso de immortalización había afectado a la capacidad de síntesis de colágeno VII. Para ello, queratinocitos de la línea RDEB-E67A6 se transdujeron con el vector retroviral HuCol7-pLZRS-Ires-Zeo portador del ADNc del gen *COL7A1*. Este vector había sido utilizado previamente en experimentos de terapia génica de reemplazamiento (Baldeschi *et al.*, 2003; Gache *et al.*, 2004) en los que se demostraba que tras la transducción de queratinocitos primarios EBD se conseguía síntesis permanente y a altos niveles de colágeno tipo VII recombinante biológicamente activo.

De manera consecuente, la inmunofluorescencia de las células transducidas y seleccionadas con zeocina reveló, claramente, la presencia de colágeno VII en la totalidad de las células visualizadas (Figura 27a) a diferencia de los queratinocitos no transducidos (Figura 27b) donde se apreció una ausencia total de proteína como era de esperar. El restablecimiento de la expresión de colágeno VII en los queratinocitos infectados con el vector retroviral, permitió demostrar que la línea RDEB-E67A6, a pesar del proceso de immortalización al que había sido sometida, mantenía la capacidad de síntesis de dicha proteína.

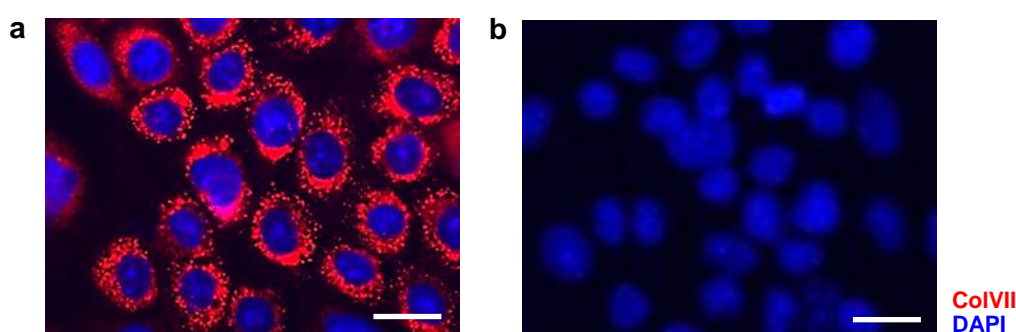


Figura 27. Análisis mediante inmunofluorescencia de la expresión de colágeno VII en queratinocitos de la línea inmortalizada RDEB-E67A6 transducidos (a) y no transducidos (b) con el vector HuCol7-pLZRS-Ires-Zeo portador del ADNc del gen *COL7A1*. Tras 7 días de selección con zeocina, el 100% de las células transducidas con el vector mostraron una intensa tinción citoplásmica indicativa de la síntesis activa de colágeno VII. El patrón citoplásmico punteado de la tinción es coherente con la presencia de colágeno VII en el compartimento secretor de las células. Núcleos marcados en azul con DAPI. Barra de escala= 25µm.

2. EDICIÓN GÉNICA PARA LA CORRECCIÓN EFICIENTE DE LA MUTACIÓN c.6527insC ALTAMENTE PREVALENTE EN LA POBLACIÓN ESPAÑOLA DE PACIENTES CON EBDR

Como se ha comentado previamente, la mutación c.6527insC se encuentra en un alto porcentaje de los pacientes EBDR diagnosticados en población española (Escamez *et al.*, 2010). Esta mutación, situada en el exón 80 del gen *COL7A1*, origina un cambio en el marco de lectura que da lugar a la aparición de un codón de terminación prematuro cuya consecuencia es una ausencia total de colágeno VII en la unión dermo-epidérmica de estos pacientes.

Dado el elevado número de pacientes que presenta esta mutación, se decidió abordar la corrección del gen *COL7A1* mediante distintas estrategias de edición génica con el fin de restaurar la expresión de proteína de modo preciso y bioseguro.

A continuación se describirán las diferentes herramientas moleculares empleadas para llevar a cabo esta corrección, así como los distintos ensayos realizados en la línea RDEB-E67A6. Esta línea de queratinocitos representa, como vimos en anteriores apartados, un modelo celular muy útil para el ensayo de protocolos de terapia génica clonal por su alta clonogenicidad y reproducción del fenotipo de la EBDR.

2.1. Generación de nucleasas TALEN diseñadas para cortar en las proximidades de la mutación c.6527insC

La corrección *ex vivo* de la mutación c.6527insC se realizó mediante técnicas de edición génica basadas en nucleasas TALENs. Para ello, se diseñaron en primer lugar una serie de TALENs con el Software TALEffector-Nucleotide Targeted (Doyle *et al.*, 2012) y se eligieron las secuencias más adecuadas para la construcción de cada pareja. Debido a que se ha comprobado que deleciones en el extremo carboxiterminal aumentan significativamente la actividad nucleasa (Miller *et al.*, 2011), se decidió construir proteínas TALEN conservando tan sólo 30 aminoácidos de dicha región. Además, se incluyó una secuencia entre el dominio de unión al ADN y el dominio nucleasa FokI que codifica para los nueve aminoácidos del péptido HA para permitir la inmunodetección de las TALENs con anticuerpos anti-HA (diseño +30+HA, Figura 28a). El dominio N-terminal se mantuvo intacto. La expresión de las nucleasas en estas construcciones fue dirigida por el promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK). Según el diseño +30+HA y mediante el método Golden Gate (Cermak *et al.*, 2011) se construyeron un total de 17 TALENs (Tabla 5). Con la misma especificidad de unión al ADN pero basadas en el diseño denominado +63, se construyó otra serie de nucleasas. De acuerdo a este diseño, las nucleasas conservarían 63 aminoácidos del extremo carboxilo terminal y presentarían una deleción de 152 aminoácidos en el extremo amino-terminal (Figura 28a). Para la construcción de TALENs basadas en el diseño +63 se utilizó el plásmido pCAG-T7-TALEN como vector destino. El sitio de corte de las diferentes parejas de TALENs construidas se muestra en la Figura 28b. Las construcciones con el diseño +30+HA se transfectaron individualmente en células 293-T para comprobar, posteriormente, la correcta expresión de las correspondientes proteínas TALEN mediante Western blot usando anticuerpos anti-HA (Figura 28c).

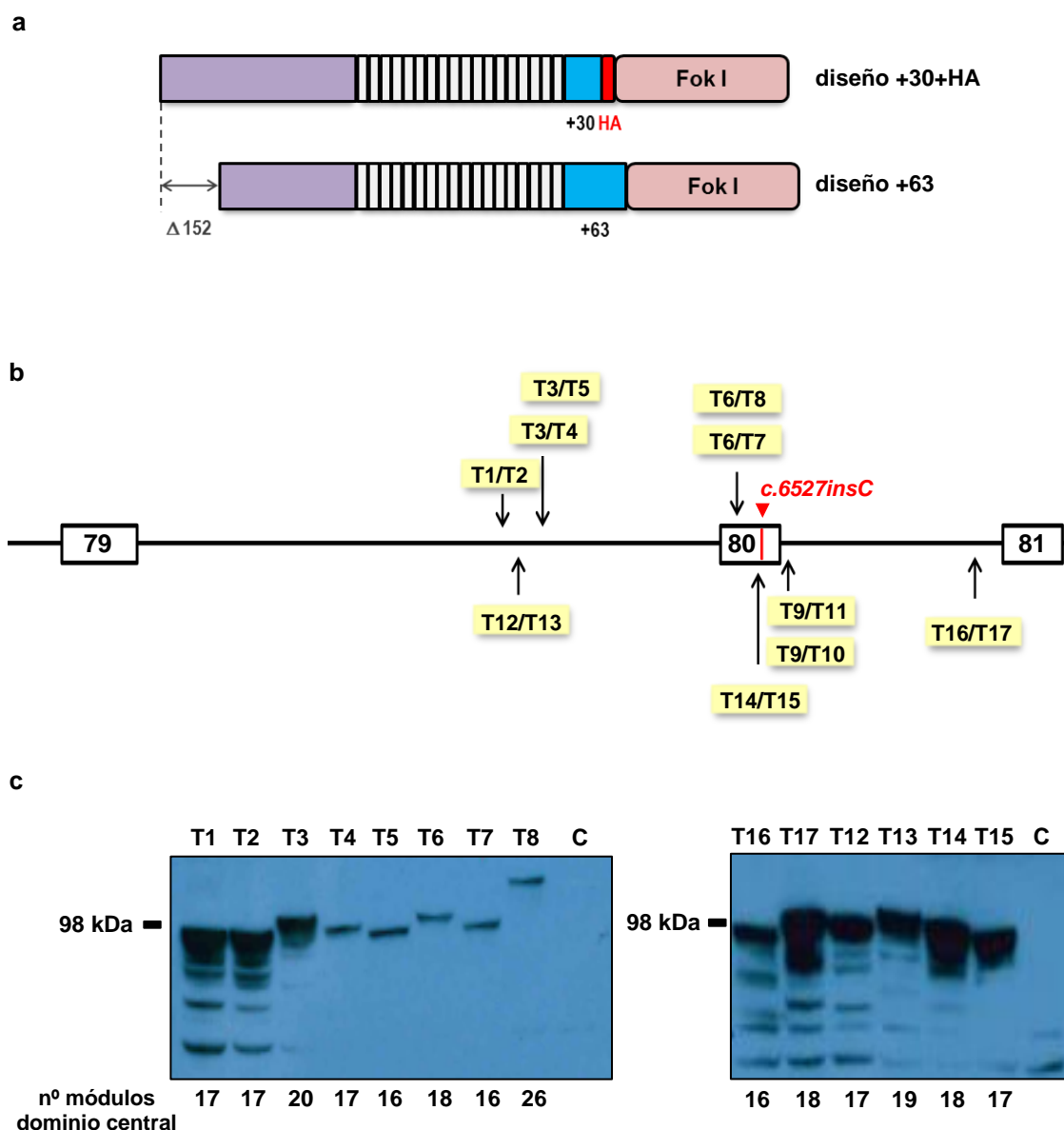


Figura 28. Diseños, sitios de corte y análisis de la expresión de las construcciones TALEN. a) Esquema de los dos diseños usados para la construcción de TALEN. b) Localización de las distintas parejas de nucleasas construidas. Todas las parejas fueron diseñadas para cortar en las proximidades de la mutación c.6527insC, situada en el exón 80 del gen *COL7A1*. c) Análisis de la expresión, por Western blot, de las proteínas TALEN en lisados de 293-T transfectadas con las diferentes construcciones. El tamaño de cada proteína varía en función del número de módulos del dominio central de unión al ADN. C (control): células 293-T no transfectadas.

TALEN F	TALEN R	TALEN F (nº módulos)	TALEN R (nº módulos)	ESPACIADOR (pb)	RVDs TALEN F	RVDs TALEN R
T1	T2	17	17	13	NG NN HD NI NN NN HD HD NN NG NN NG NN NG NN HD	NG NI HD HD NG NI HD HD NI HD HD NI NG NN NN NI HD NG NN
T3	T4	20	17	18	NI NG HD NG NI NG NN NI NN NI NN NN HD NI NN NG HD HD NI NG	NI HD HD NG HD NI HD HD HD NG NG NG HD HD NI NN NG
T3	T5	20	16	23	NI NG HD NG NI NG NN NI NN NI NN NN HD NI NN NG HD HD NI NG	HD HD NI NG NI HD HD NG HD NI HD HD HD NG NG NG
T6	T7	18	16	14	NN HD HD HD NG HD NG HD NG NI NG NN NG NI NN NN NG	NN NN NN HD HD NI NN NN NN NN NN NN NN NN HD HD NG
T6	T8	18	26	14	NN HD HD HD NG HD NG HD NG NI NG NN NG NI NN NN NG	NI HD NG HD NI HD HD NI HD NG NN NN NN HD HD NI NN NN NN NN NN HD HD NG
T9	T10	24	24	12	HD HD NI NI NN NI NN NN HD HD HD HD HD NG NN NN HD HD NI NN NG	NN NN NN NN NN HD NI NI NN NI HD NI NN NN NN NN NN NN NN NG HD NG
T9	T11	24	21	15	HD HD NI NI NN NI NN NN HD HD HD HD HD NG NN NN HD HD NI NN NG	NN NN NN NN NN HD NI NI NN NI HD NI NN NN NN NN NN NN NG
T12	T13	17	19	24	NN HD NI NN NN HD HD HD NN NG NN NG NN NG NN HD NG	HD HD NI NN NG HD NI HD NI NN NI NG NI NG NI HD HD NG
T14	T15	18	17	20	NI NG NN NG NI NN NN NN NG HD NG NN HD NI NN NN NN NG	HD NG NG NN NN NG NI HD NG HD NI HD HD NI HD NG
T16	T17	16	18	19	NN HD NN NN HD NG NI NI HD NG HD HD HD HD NG	HD HD NI HG NN NI HD HD NI HD HD NG NN NG NN NG

Tabla 5. Pares de TALEN diseñadas para cortar en la región del exón 80 del gen COL7A1. Un total de 17 nucleasas TALEN fueron construidas. Para cada pareja se indican los RVDs (residuos divariables, del inglés *repeat-variable di-residue*) responsables del reconocimiento específico de nucleótidos (NG=T; HD=C; NI=A; NN=G/A), así como la distancia (en pb) existente entre las secuencias diana de la TALEN directa (F) y la reversa (R).

Una vez comprobada la correcta expresión de todas las construcciones, se procedió a analizar la funcionalidad de cada una de las parejas de TALENs. Para ello, se realizaron transfecciones en células 293-T y se evaluó la capacidad de generación de *indels* en el sitio diana mediante la realización del ensayo de CEL-1 (Surveyor) (Figura 29). Todos los pares probados con este protocolo mostraron una buena actividad nucleasa obteniéndose resultados similares para el diseño +30+HA y el diseño +63. Debido a que el diseño +30+HA permitía la inmunodetección eficiente de las proteínas TALEN, se decidió utilizar las nucleasas con este diseño en los experimentos posteriores.

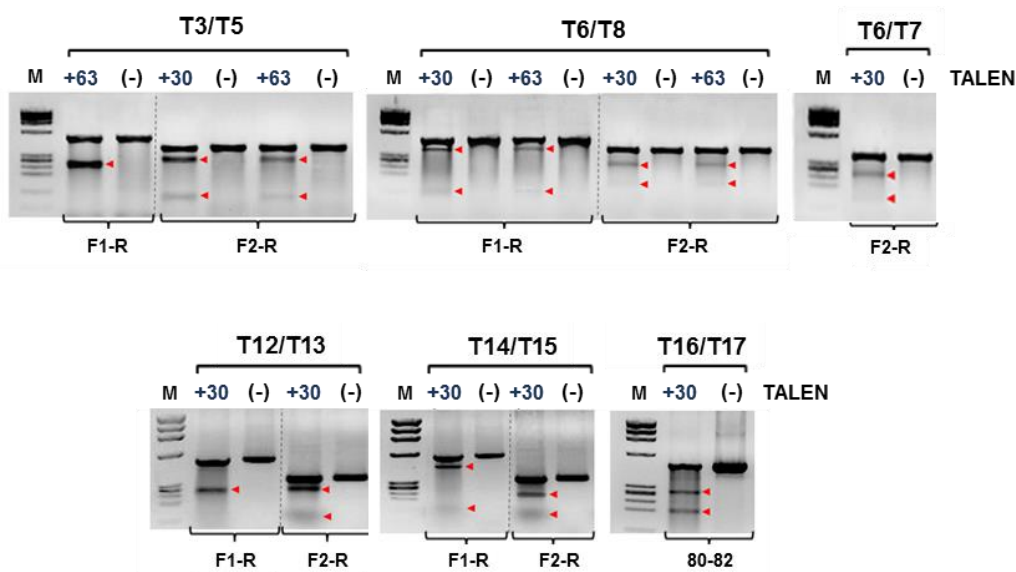


Figura 29. Ensayo de CEL-1 para la estimación de la actividad nucleasa de parejas de TALENs transfectadas en células 293-T. Se compararon TALENs con la misma secuencia diana de reconocimiento pero diferentes truncaciones en los extremos amino y carboxilo terminal (diseños +30+HA y +63). Diferentes amplicones que incluían el sitio de corte de las nucleasas, y generados con los oligonucleótidos denominados F1/R, F2/R y 80-82, se digirieron con la enzima CEL-1 tras ser sometidos a la formación de heterodúplex. Las flechas rojas indican los productos de la digestión. Control (-): sin nucleasa CEL-1. M: marcador de peso molecular IX.

2.2. Generación de vectores adenovirales para la expresión de nucleasas TALEN en queratinocitos

Uno de los factores clave a tener en cuenta cuando se diseñan protocolos de terapia génica mediada por nucleasas es el de encontrar un sistema adecuado para la introducción de dichas herramientas moleculares en las células diana de una forma eficaz y segura. Debido a que la nucleofección o la transfección, probadas previamente en nuestro laboratorio, no resultaron técnicas eficaces para la introducción de TALENs en queratinocitos humanos, se decidió construir vectores virales para la expresión transitoria de estas nucleasas. En concreto, se construyeron vectores adenovirales bicistrónicos para la expresión de TALEN y de un gen marcador (GFP) bajo la acción de un promotor PGK.

De todas las TALENs construidas y, posteriormente testadas por parejas en células 293-T, se eligieron siete para ser introducidas en vectores adenovirales: T1, T2, T6, T7, T13, T14 y T15. El criterio de elección se basó, principalmente, en la posición del sitio de corte en el locus *COL7A1* (Figura 30).

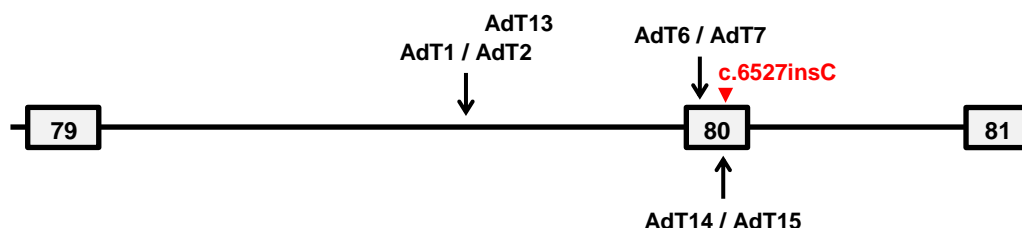


Figura 30. TALENs elegidas para ser expresadas con vectores adenovirales en queratinocitos humanos. Las secuencias diana de reconocimiento de las nucleasas se localizaban en el intrón 79 y el exón 80 del gen *COL7A1*.

A continuación se procedió a la construcción, producción y purificación de los adenovirus recombinantes (para más detalle ver apartados 13 y 14 de Materiales y Métodos).

2.2.1. Caracterización de las preparaciones adenovirales

La caracterización de los stocks adenovirales purificados incluyó la determinación de la integridad y cantidad de genomas recombinantes empaquetados, así como la verificación de la expresión y la funcionalidad de los productos codificados. Para ello, una vez extraídas las partículas AdV tras ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio, se procedió, en primer lugar, a la cuantificación del título viral (Tabla 6) mediante un procedimiento rápido basado en la desorganización de la cápside adenoviral por la acción de un detergente y posterior cuantificación por espectrofotometría del ADN liberado. La determinación del título viral fue esencial para poder determinar la cantidad de virus óptima a usar en los diferentes experimentos.

Ad TALEN	partículas virales/mL
Ad-T1	2,82x10 ¹²
Ad-T2	2,36x10 ¹²
Ad-T6	4,46x10 ¹²
Ad-T7	2,36x10 ¹²
Ad-T13	3,42x10 ¹²
Ad-T14	2,78x10 ¹²
Ad-T15	2,54x10 ¹²

Tabla 6. Título viral obtenido en las purificaciones por ultracentrifugación en gradiente de CsCl. Se alcanzaron títulos del orden de 10¹² partículas virales (PV)/mL en las siete preparaciones. La producción de altas cantidades del vector fue posible gracias a que los adenovirus de primera generación se pueden autorreplicar en las correspondientes células empaquetadoras.

La comprobación de la integridad del genoma de los diferentes adenovirus recombinantes purificados se realizó mediante un análisis de restricción convencional (Figura 31). Además, este análisis se complementó con la secuenciación completa de las repeticiones en tándem del dominio central de unión al ADN. La lectura de los cromatogramas reveló, como única alteración, la

presencia de una mutación puntual (G>A) en el primer nucleótido del codón que codificaba para el residuo de la posición 13 de la quinta repetición del dominio central de la TALEN T1. Esta mutación estaba presente en el ADN de la preparación final, pero no en la construcción inicial, y surgió por tanto durante el proceso de expansión del vector viral. Al afectar al RVD de una de las repeticiones, podría alterar la unión de la nucleasa a su correspondiente secuencia diana. Este hallazgo puso de manifiesto la importancia de comprobar hasta el nivel de secuenciación las preparaciones adenovirales finales. En ningún caso se detectaron reordenamientos o deleciones de las repeticiones del dominio central de unión al ADN.

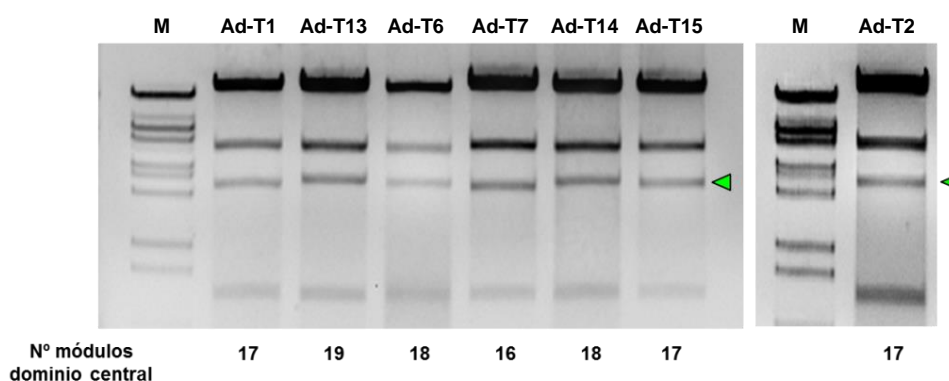


Figura 31. Caracterización del ADN aislado de las partículas Ad-TALEN purificadas por ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio. Se muestra la electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de restricción obtenidos tras digestión de los genomas virales con EcoRI. Las bandas indicadas por la flecha verde contienen la secuencia correspondiente al dominio central y por tanto, su tamaño depende del número de módulos de repetición que presente la TALEN. Los tamaños de esta banda diferencial son: 3875 pb (16 módulos), 3977 pb (17 módulos), 4079 pb (18 módulos) y 4181 pb (19 módulos). M: marcador de peso molecular Lambda DNA/BstEII.

Una vez conocido el título viral conseguido en las purificaciones y analizado el ADN recombinante por digestión y secuenciación, el siguiente paso fue comprobar la capacidad de los vectores adenovirales para transducir queratinocitos humanos y expresar las proteínas TALEN. Para ello, células de la línea RDEB-E67A6 se infectaron a una MOI de 1000 PV/célula. Tras observar una expresión de GFP intensa y generalizada para los seis vectores adenovirales, se analizó tanto por Western blot (Figura 32a) como por inmunofluorescencia (Figura 32b) la expresión de las proteínas TALEN utilizando, para ello, un anticuerpo anti-HA. Se apreció, en ambas técnicas, una expresión altamente eficiente y comparable para todas las TALENs.

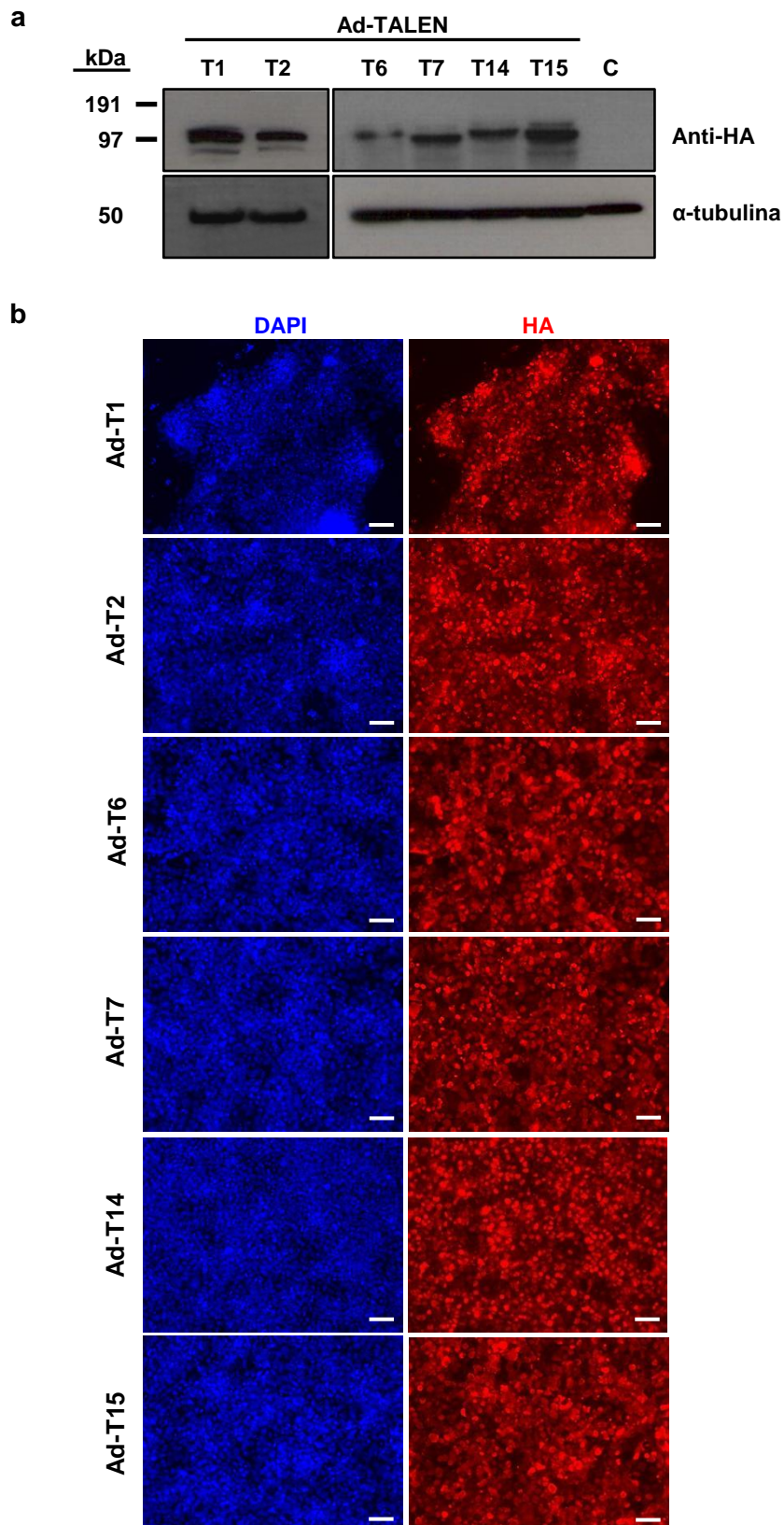


Figura 32. Expresión de las proteínas TALEN en queratinocitos de la línea RDEB-E67A6 transducidos con los vectores adenovirales. a) Análisis por Western blot de lisados celulares de la línea transducida. La expresión de tubulina se analizó en las mismas muestras como control de carga. C: células control sin transfectar. b) La inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-HA muestra la expresión intensa y generalizada de las proteínas TALEN en queratinocitos RDEB-E67A6. La barra de escala representa 50 μ m.

Por último, la funcionalidad de las nucleasas vehiculizadas en vectores adenovirales se comprobó analizando la generación de *indels* en la línea RDEB-E67A6 mediante el ensayo de CEL-1. Como se aprecia en la Figura 33a, de las tres parejas de Ad-TALEN testadas a una MOI de 1000 PV/célula, la formada por el par Ad-T6 y Ad-T7 fue la que mostró una mayor actividad. La completa falta de actividad del par T1/T2 es probablemente debida a la mutación presente en un RVD de la TALEN T1 que identificamos por secuenciación.

El par Ad-T6 /Ad-T7 (Figura 33b), por su elevada actividad, fue el elegido para llevar a cabo los experimentos de edición génica.

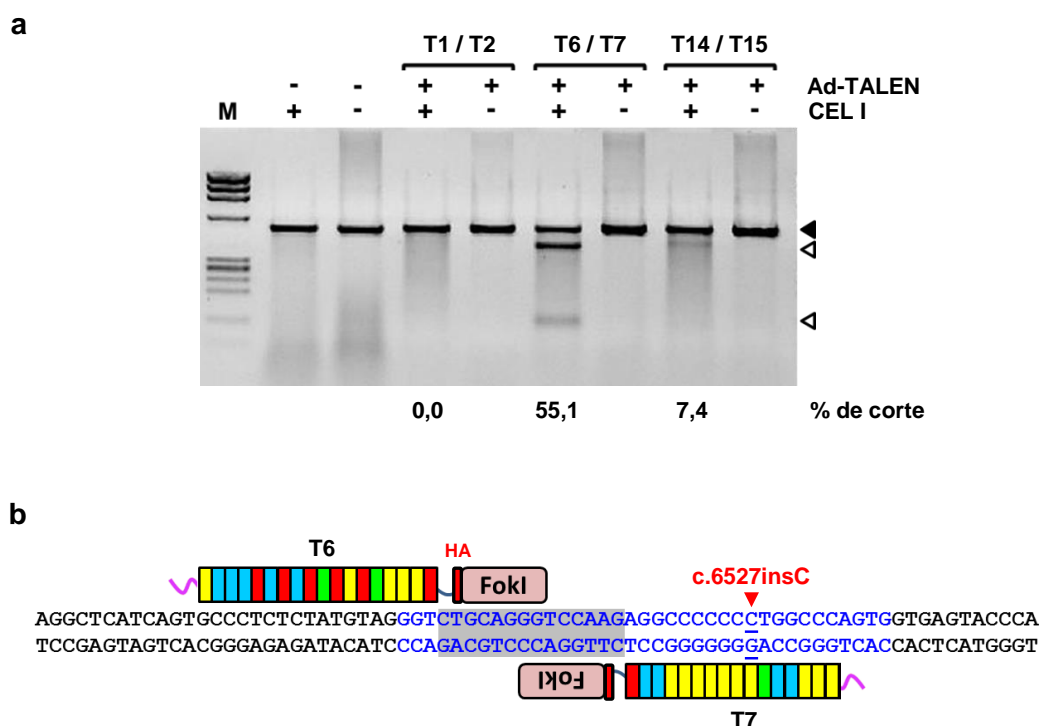


Figura 33. a) Ensayo de CEL-1 para la detección de cortes de doble hebra en sitios específicos tras la transducción con los vectores adenovirales portadores de las nucleasas TALEN. Queratinocitos de la línea RDEB-E67A6 se co-transdujeron con los vectores adenovirales en una proporción 1:1 (Ad-TALEN F/Ad-TALEN R) a una MOI total de 1×10^3 PV/célula. El producto de PCR conteniendo los sitios diana de corte de las diferentes nucleasas y generados con los oligonucleótidos F1/R se sometieron a un ciclo de desnaturalización seguido de uno de renaturalización para forzar la formación de heterodúplex. Las regiones de desapareamiento entre las cadenas del heterodúplex por la presencia de *indels* debido a la reparación por NHEJ de las roturas de doble hebra, fueron susceptibles de ser reconocidas por la enzima CEL-1 dando lugar a fragmentos de menor peso molecular cuyas posiciones se indican con las cabezas de flecha blancas. La cabeza de flecha negra indica producto de PCR no digerido. El porcentaje de corte para cada producto de PCR se muestra en la parte inferior del gel. M: marcador de peso molecular IX. b) Representación esquemática de la pareja de TALEN (T6/T7) que se empleó en los experimentos de edición génica del gen *COL7A1*. El exón 80 se muestra en letra azul y el sitio de la mutación (c.6527insC) se señala con una flecha roja. La secuencia del espaciador (14 pb) se indica en el rectángulo gris.

2.2.2. Análisis de posibles sitios de corte fuera de diana de la TALEN T6/T7

Aunque las TALENs, al igual que el resto de las nucleasas, corten eficientemente en la secuencia deseada para la cual fueron diseñadas, la principal preocupación es la introducción de cortes en sitios fuera de diana (Juillerat *et al.*, 2014). Disponer de nucleasas altamente específicas es esencial en terapia génica. Por este motivo, analizamos la actividad de T6/T7 sobre localizaciones del genoma con secuencias que presentaban similitud a la secuencia diana.

La predicción de posibles sitios de corte se realizó con la herramienta online PROGNOS (Tabla 7). Tras la amplificación de las regiones genómicas de interés empleando los oligonucleótidos diseñados por el propio programa (ver Tabla 3, apartado 12 de Materiales y Métodos) se evaluó, en cada uno de los 20 sitios seleccionados, la presencia de *indels* mediante el ensayo de CEL-1 (Figura 34). Además, todos los productos de amplificación fueron secuenciados. El análisis de los sitios de corte fuera de diana se realizó tanto en la línea de queratinocitos RDEB-E67A6 como en fibroblastos de paciente EBDR transducidos con los vectores Ad-T6 y Ad-T7. Los resultados revelaron que la pareja de nucleasas T6/T7 no generaba cortes fuera de diana detectables con el ensayo CEL-1 en ninguna de las posiciones analizadas. La actividad CEL-1 observada en los sitios (#7, 8, 10 y 13) se debió a la presencia en heterocigosis de SNPs ya descritos.

#	cromosoma	gen	región genómica	tipo	espaciador (pb)	secuencia diana F	secuencia diana R	nº de desapareamientos
Diana	Chr3	COL7A1	exón	LR	14	TGCCCTCTCTATGTAGGGT	TGGGCCAGGGGGGGCCT	0
1	Chr19	NFIX	intrón	RR	22	cGGtggAGGcGGGGCCT	TGGGCCcGGGGGGGGCCT	6
2	Chr12	TPCN1	intrón	RR	11	TGGGgCAGGaGGGGCCT	TGGGagAGGaGGaGCCT	6
3	Chr20	GDF5	exón	RR	17	caGGCCAGGAttGGCCa	cGGGCCAGGGGGGGCCT	7
4	Chr1	ARHGEF19	intrón	RR	12	TGGGcagGGcAGGGCCT	gGGtCCAGGGGGGGCCT	7
5	Chr1	PROX1	intrón	RR	17	caGGggAGGGaAGGCCT	TGGGCCAtGGGaAGGCCT	7
6	Chr3	LRIG1	intrón	RR	16	TGGGCCcGGGgaAGGCCT	TGGGgaAGGGGaGcCCc	7
7	Chr22	-	intergénico	RR	13	caGcCCAGGGGaGCCT	TGGGCCcGGGgaGCCT	7
8	Chr11	CTSD	exón	RR	24	TGGGCCAGGGGGGcCCT	ctGGCCAGtcGGGaCCa	7
9	Chr3	-	intergénico	RR	17	TGGGCCAGGGaGaGCCT	TGacCatGGGaGGGCCc	8
10	Chr17	RBFOX3	intrón	RR	23	TGgaCCAGGGcctGCCT	TGcGCCAGaaGaGGCCT	8
11	Chr19	TBCB	intrón	RR	20	TGaGcTAgGaGGGcCCT	TcaGCCAGaGGGaGCCT	8
12	Chr3	COL7A1	intrón	RR	21	TGGGCCtGGGaGGGCCT	TGaGggAGGtaGGGCCc	8
13	Chr3	FAMD3	intrón	RR	28	TaGaCCAGGGaGGGCCc	TGGGCCAGGctacaCCT	9
14	Chr3	COL7A1	intrón	RR	10	aGGGCCTGGGtGGGCCT	TGaGggAGGtaGGGCCc	9
15	Chr10	-	intergénico	RR	24	TaGcCaAGGGaGcCCT	TGGGCCAGaaGGCaCCT	10
16	Chr3	COL7A1	exón	RR	10	TGgaCCActGGGGaCc	gaaGCCctGGGGGGCCa	11
17	Chr3	COL7A1	exón	RR	17	TGccaCAGGGaGaGCCT	TGGGCCctcGaGGaCCc	11
18	Chr3	COL7A1	exón	RR	19	TtGGaCcccaGGGGCCT	ctGGCCAGGaGGGcCCa	11
19	Chr3	COL7A1	5'-UTR	RR	27	TGctCCAGGtGGGGggc	AGGCagCCCCtCCCCc	11
20	Chr3	COL7A1	intrón	RR	25	ggGacCTGaGGGctCCT	gGGtCCtGGGGGacCCT	12

Tabla 7. Sitios candidatos de corte fuera de diana de la TALEN T6/T7 identificados por la herramienta online PROGNOS (<http://bao.rice.edu/Research/BioinformaticTools/prognos.html>). El genoma humano (hg19) fue escaneado en busca de potenciales sitios de unión tanto para la configuración heterodimérica T6(L) / T7(R) (LR) como las homodiméricas RR o LL. Los 20 sitios seleccionados para el posterior análisis (#1 al #20), implicaron homodímeros de la TALEN T7. Se indica el cromosoma y el gen donde se localiza cada posible sitio de corte así como la distancia de separación, en pares de bases, de los dos componentes de la pareja. Los desapareamientos entre las posibles secuencias de unión con respecto a la canónica (primera fila) se muestran en letra minúscula y destacada en rojo.

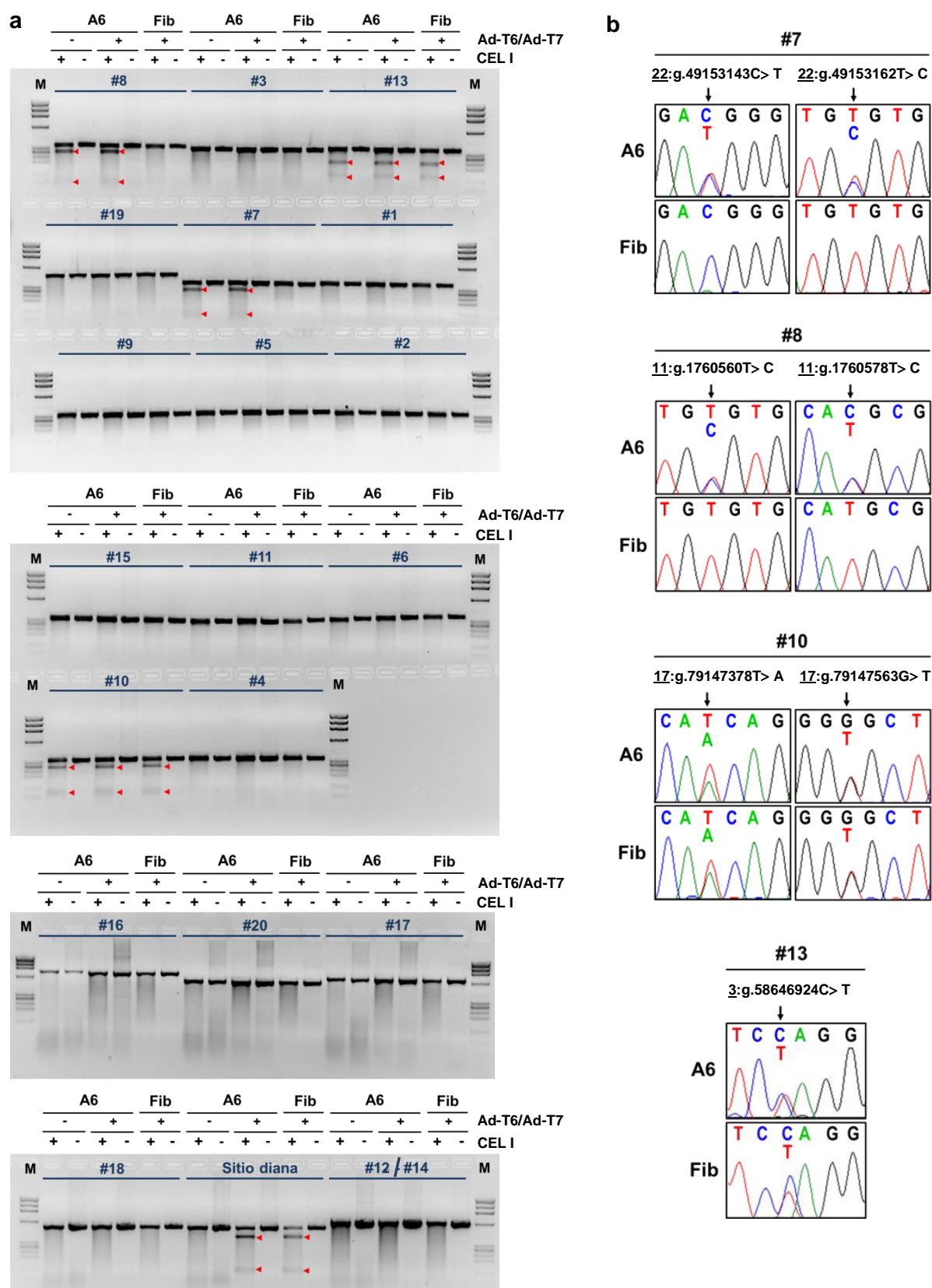


Figura 34. Análisis de posibles sitios de corte fuera de diana de la TALEN T6/T7 calculados con la herramienta bioinformática PROGNOS. a) Amplificación por PCR de 20 posibles sitios de corte y análisis de la presencia de *indels* mediante el ensayo de CEL-1. Como control se amplificó un fragmento conteniendo el sitio diana de corte y se sometió, igualmente, a digestión con la enzima CEL-1. b) Cromatogramas que muestran los SNPs en heterocigosis responsables de las bandas de menor tamaño (flechas rojas) observadas en la figura (a). Nomenclatura de los SNPs según la base de datos genética Ensembl (<http://ensembl.org/index.html>). Fib: fibroblastos.

Una vez conseguida con éxito la expresión transitoria en queratinocitos humanos mediante vectores adenovirales de una pareja de nucleasas TALEN (T6 y T7), capaz de introducir de manera eficaz y específica cortes de doble cadena en una secuencia próxima a la mutación c.6527insC, se decidió abordar la edición del gen *COL7A1* mediante dos estrategias que implican la reparación de las roturas en el ADN a través de dos vías diferentes:

- Reparación Dirigida por Homología (HDR, del inglés *Homology-Directed Repair*).
- Reparación por el mecanismo de NHEJ.

2.3. Corrección de la mutación c.6527insC por recombinación homóloga

Para abordar la corrección por recombinación homóloga de la mutación c.6527insC se usaron, conjuntamente, un vector AAV para la introducción del ADN molde en las células diana, y los vectores adenovirales Ad-T6 y Ad-T7 para la generación de roturas de doble hebra en las proximidades de la zona a corregir e incrementar la frecuencia de eventos de recombinación.

La finalidad de esta estrategia fue la sustitución del exón 80 del locus *COL7A1* con la mutación insercional c.6527insC por la correspondiente secuencia silvestre aportada por el ADN molde (Figura 35).

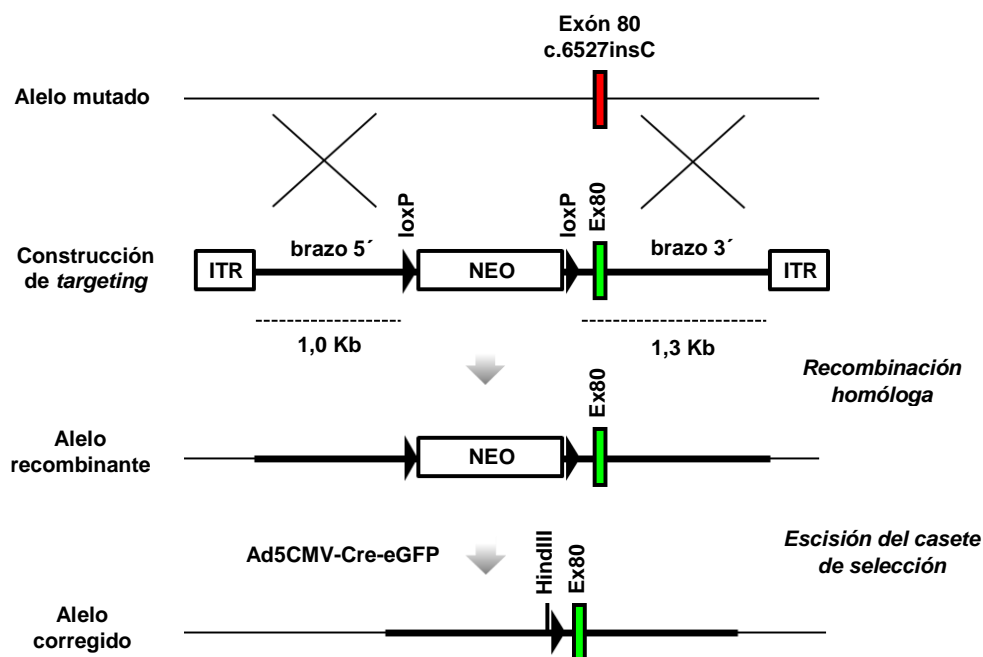


Figura 35. Esquema explicativo de la estrategia de recombinación homóloga llevada a cabo para la corrección del alelo mutado en el exón 80 del locus *COL7A1*. Las construcciones de *targeting* empaquetadas en vectores AAVr contenían un casete de selección neo floxeadado flanqueado por dos brazos de homología: brazo 5' (1,0 Kb) y brazo 3' (1,3 Kb). El brazo 3' portaba la secuencia silvestre del exón 80. Para permitir la caracterización molecular por Southern blot de los clones recombinantes, se introdujo un sitio de restricción HindIII en la base del brazo 5'. La expresión transitoria de la recombinasa Cre mediada por un vector adenoviral permitió la escisión del casete de selección del alelo recombinante para dar lugar al alelo corregido. LoxP: secuencia de reconocimiento de la recombinasa Cre.

2.3.1. Vectores de *targeting*

Los genomas recombinantes de los vectores adenoasociados empleados en los experimentos de recombinación homóloga contenían secuencias genómicas con homología a la región del gen *COL7A1* que se pretendía sustituir, incluyendo la secuencia silvestre del exón 80 en el brazo 3', así como un casete de resistencia a la neomicina (casete neo), flanqueado todo ello por señales de empaquetamiento del AAV.

Se emplearon dos construcciones de *targeting* diferentes, designada como AAV-PGK-neo y AAV-SA-2A-neo (ver Figura 15, apartado 17.1 de Materiales y Métodos). La diferencia entre ambas construcciones radicaba en el diseño del casete de selección, lo cual permitía abordar dos estrategias de recombinación homóloga diferentes:

- **AAV-PGK-neo**: vector basado en un casete de expresión constitutiva de Neo. El casete de expresión para neomicina está dirigido por el promotor de la fosfoglicerato kinasa (PGK).
- **AAV-SA-2A-neo**: vector con trampa de *splicing*. El casete de selección neo, en estos vectores, carece de promotor y está fusionado a la secuencia del péptido 2A del teschovirus la cual, a su vez, se encuentra precedida por una secuencia de aceptación de *splicing* (SA). Esta estrategia permite una selección más restrictiva de los clones recombinantes ya que la expresión del gen *neo* sólo ocurre cuando la integración de la construcción se produce en un intrón de un gen que se está expresando.

Los brazos de homología en ambas construcciones abarcaban los exones del 76 al 79 (brazo 5', 1,0 Kb) y los exones del 80 al 86 (brazo 3', 1,3 Kb). De esta manera el exón 80 quedaba situado en la base del brazo de mayor longitud para que la posición fuera lo más central posible y cercana al casete de selección. La suma de la longitud de ambos brazos era de 2,3 Kb para que el tamaño final de las construcciones fuera ~ 5 Kb y por tanto empaquetable en vectores AAV.

Los casetes de selección de ambos vectores se encontraban flanqueados por sitios loxP que permitían la eliminación del casete, una vez comprobado el evento de *targeting*, mediante la expresión transitoria de la recombinasa Cre.

Las construcciones de *targeting* se empaquetaron, en colaboración con el laboratorio de la profesora Hildegard Büning (Universidad de Colonia), en vectores adenoasociados cuyas cápsides, derivadas del serotipo 2 por ingeniería genética para optimizar la interacción vector-célula diana, presentaban una elevada capacidad de transducción de queratinocitos humanos. Las dos variantes de cápsides ingenierizadas utilizadas se designaron como Kera1 y Kera2. Ambas variantes presentan una inserción de 7 aminoácidos: RGDTATL (Kera1) y PRGDLAP (Kera2) en la posición 587 de la cápside.

Como se mostrará en el siguiente apartado, preparaciones de AAVr tanto con la cápside Kera1 como con la cápside Kera2 fueron empleadas en los experimentos de *gene targeting* para comparar las tasas de recombinación obtenidas por ambas variantes.

2.3.2. Experimentos de *gene targeting*: co-transducción de la línea RDEB-E67A6 con los vectores AAVr y los vectores adenovirales Ad-T6 y Ad-T7

Antes de proceder a la realización de los experimentos de recombinación homóloga fue fundamental determinar la concentración óptima de G-418 necesaria para seleccionar las células en las condiciones de crecimiento establecidas para este experimento. Para ello, queratinocitos de la línea RDEB-E67A6 sin transducir se sembraron a concentraciones crecientes de antibiótico. Se determinó que la concentración de G-418 de 100 $\mu\text{g/mL}$ era suficiente para causar la muerte de la totalidad de las células sembradas en 8-9 días. Una vez establecida la concentración de antibiótico a utilizar, se iniciaron los experimentos de *gene targeting*. Así pues, queratinocitos de la línea RDEB-E67A6 se co-transdujeron con los vectores adenoasociados (portadores de las construcciones de recombinación homóloga PGK-neo y SA-2A-neo) y los vectores adenovirales (portadores de las TALENs T6 y T7) y se cultivaron en presencia de antibiótico G-418 a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$. A partir de 10 días de selección, las colonias formadas se fueron aislando y expandiendo para su posterior genotipado por PCR.

2.3.3. Genotipado por PCR de los clones resistentes a G-418

El genotipado por PCR permitió detectar eventos de recombinación homóloga en el locus *COL7A1*. En primer lugar, se usaron oligonucleótidos complementarios a la secuencia genómica situada inmediatamente a ambos lados de las construcciones de *targeting* (oligonucleótido 1: hibrida en el exón 75; oligonucleótido 4: hibrida en el exón 87). De esta manera, se amplifica específicamente un fragmento de 2,4 Kb para los alelos en los que no se ha producido evento de *targeting* y se obtiene, por el contrario, un fragmento de 4,1/4,2 Kb (dependiendo de la construcción empleada) para los alelos recombinantes. A modo de ejemplo, en la Figura 36a se muestra el genotipado por PCR con los oligonucleótidos 1 y 4 de los clones resistentes a G-418 aislados en uno de los experimentos de recombinación homóloga llevados a cabo con la construcción de trampa de *splicing* SA-2A-neo.

La presencia del alelo recombinante fue verificado con dos PCRs más, empleando las parejas de oligonucleótidos 1 y 2 (específica para el casete PGK-neo) o 1 y 2B (específica para el casete SA-2A-neo) para la amplificación del brazo izquierdo de la construcción, y la pareja de oligonucleótidos 3 y 4 para la amplificación del brazo derecho. En la Figura 36b se muestran los resultados obtenidos para la PCR 5' y la PCR 3' de los mismos clones genotipados en la Figura 36a.

Los productos de amplificación de las PCRs 5' y 3' de todos los clones recombinantes aislados en los cinco experimentos independientes de *gene targeting* se secuenciaron para verificar que la recombinación entre el ADN molde y la secuencia diana del locus *COL7A1* tuvo lugar correctamente. La secuenciación de los amplicones de la PCR 3' nos permitió identificar, dentro de los clones recombinantes, aquellos en los que la recombinación con el vector de *targeting* resultó en la corrección de la mutación c.6527insC en el exón 80. Además, hay que tener en cuenta que el alelo no editado por recombinación homóloga de los clones que hayan sido modificados en heterocigosis ha podido ser igualmente cortado por la pareja de TALENs pero haber sido reparado mediante el mecanismo de NHEJ. La secuenciación permitirá verificar también la secuencia de dichos alelos.

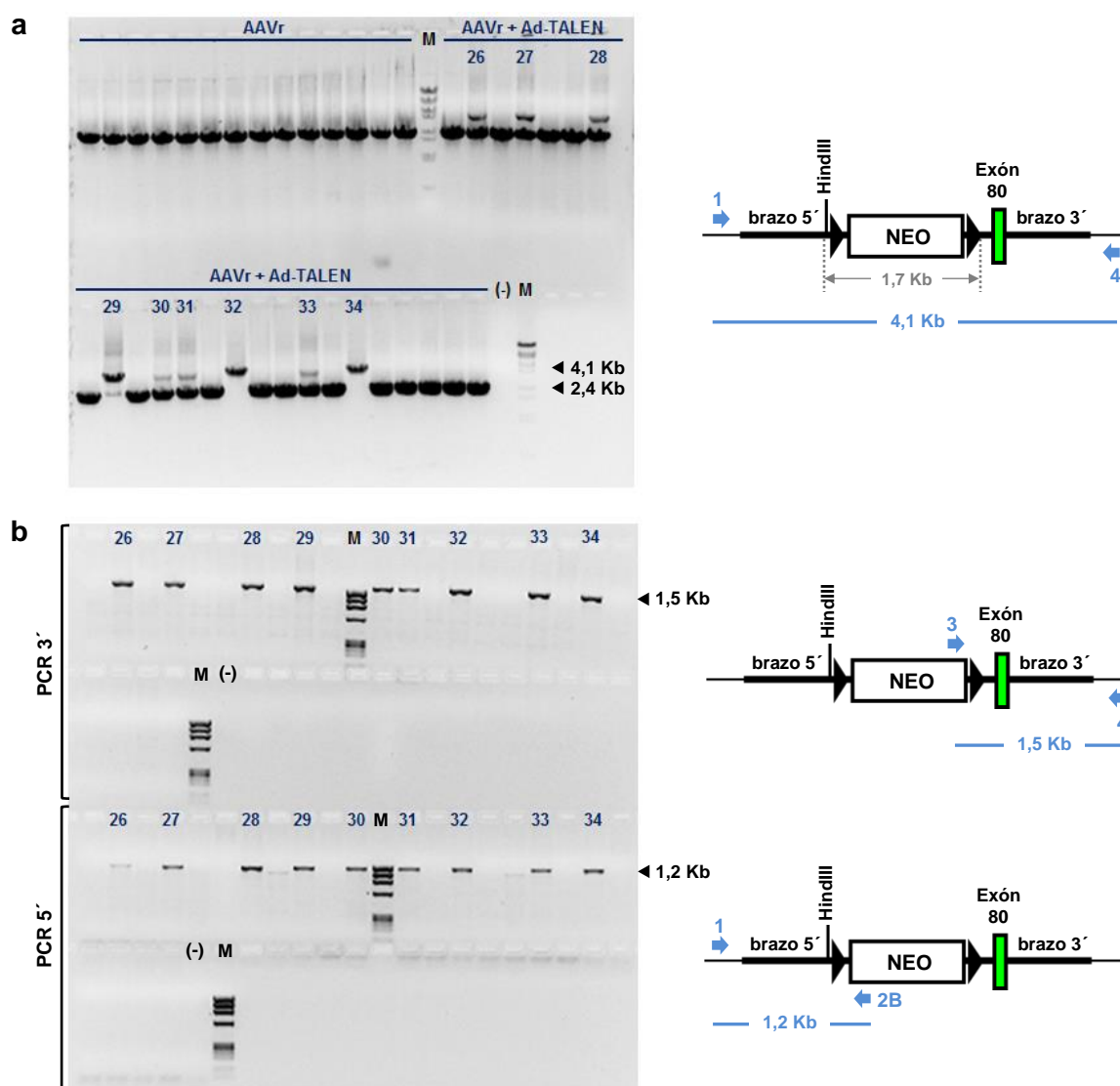


Figura 36. Genotipado por PCR de los clones resistentes al antibiótico de selección G-418 en el experimento de recombinación homóloga llevado a cabo en la línea RDEB-E67A6 con los vectores AAVr con la variante de cápside Kera2 y la construcción SA-2A-neo tanto en presencia como ausencia de los vectores Ad-T6 y Ad-T7. a) Amplificación por PCR empleando los oligonucleótidos 1 y 4. La aparición de una única banda de 4,1 Kb indicó la presencia de evento de *targeting* en ambos alelos. M: marcador de peso molecular Lambda DNA/BstEII. b) La PCR con los oligonucleótidos 3 y 4 permitió la amplificación del brazo derecho (PCR 3'), y el empleo de la pareja 1 y 2B la amplificación del brazo izquierdo (PCR 5'). Se muestran los mismos clones analizados que en (a). El oligo 2B hibrida con la secuencia de aceptación de *splicing* (SA) y el oligo 3 con la secuencia de poliadenilación presente en el casete de selección SA-2A-neo. M: marcador de peso molecular IX. Tanto en la figura (a) como en (b), a la derecha de cada gel se muestra un esquema explicativo del genotipado por PCR. Se indica la posición de hibridación de los diferentes pares de oligonucleótidos empleados, así como el tamaño de los amplicones que se obtienen para el alelo recombinante.

Los resultados de los experimentos de recombinación homóloga realizados con los dos tipos de construcciones (PGK-neo y SA-2A-neo) y las dos variantes de cápside (Kera1 y Kera2) se resumen en la Tabla 8.

Construcción de <i>targeting</i>	Cápside	Ad T6/Ad T7	Clones analizados	Clones recombinantes	Clones corregidos	Inserción en homocigosis
PGK-neo	Kera1	(+)	53	6	5	0
		(-)	20	0	-	0
	Kera2	(+)	30	4	4	0
		(+)	83	9	9	0
		(-)	45	0	-	0
SA-2A-neo	Kera1	(+)	14	6	6	1
		(-)	19	0	-	0
	Kera2	(+)	24	9	8	3
		(-)	14	0	-	0

Tabla 8. Eficiencias de *targeting* obtenidas para cada experimento de recombinación homóloga. Queratinocitos de la línea RDEB-E67A6 fueron transducidos con cuatro preparaciones de AAVr distintas las cuales diferían tanto en la variante de la cápside recombinante (Kera1 o Kera2), como en la construcción de *targeting* (PGK-neo o SA-2A-neo). Las células se transdujeron tanto en presencia como ausencia de los vectores adenovirales portadores de las TALENs T6 y T7. Un total de 302 clones fueron analizados.

Según el genotipado por PCR de los clones G-418 resistentes, la tasa de recombinación homóloga fue del 11% (19 de 166 clones) para el vector AAV-PGK-neo y del 39% (15 de 38 clones) para el vector AAV-SA-2A-neo (Tabla 8), no viéndose afectada la eficiencia de recombinación por la variante de cápside empleada para el empaquetamiento de las construcciones de *targeting*. Además, es importante destacar el número de clones corregidos bialélicamente con ambas construcciones: 4 de 15 para el diseño de trampa de *splicing* y ninguno para el diseño de expresión constitutiva de *neo*. En este último caso, todas las correcciones se produjeron en un sólo alelo. Estos resultados demostraron que la estrategia de *gene targeting* basada en el casete de trampa de *splicing* permite una selección más restrictiva de los clones recombinantes, dando lugar a un aumento de la eficiencia de recombinación en más de tres veces con respecto a la estrategia basada en un casete de expresión constitutiva de *neo*. No obstante, debido a que la EBDK es un trastorno recesivo y los portadores heterocigotos no presentan síntomas evidentes, los eventos de *targeting* en heterocigosis serían suficientes para la reversión del fenotipo. Por este motivo no consideramos necesaria una segunda ronda de *targeting* para conseguir clones homocigotos en el caso de la construcción AAV-PGK-neo.

La presencia del transcrito de fusión COL7A1/2A-neo en los clones recombinantes obtenidos mediante transducción con el vector AAV-SA-2A-neo se verificó por RT-PCR empleando un oligonucleótido directo complementario al exón 73 de COL7A1 y un oligonucleótido reverso específico de la secuencia del gen *neo*. La secuenciación del producto de 699 pb de la RT-PCR (ver secuencia en la Figura 37a) permitió comprobar la fusión en fase del transcrito de COL7A1 a la secuencia 2A y ésta, a su vez, a la secuencia neo (cromatograma mostrado en la Figura 37b).

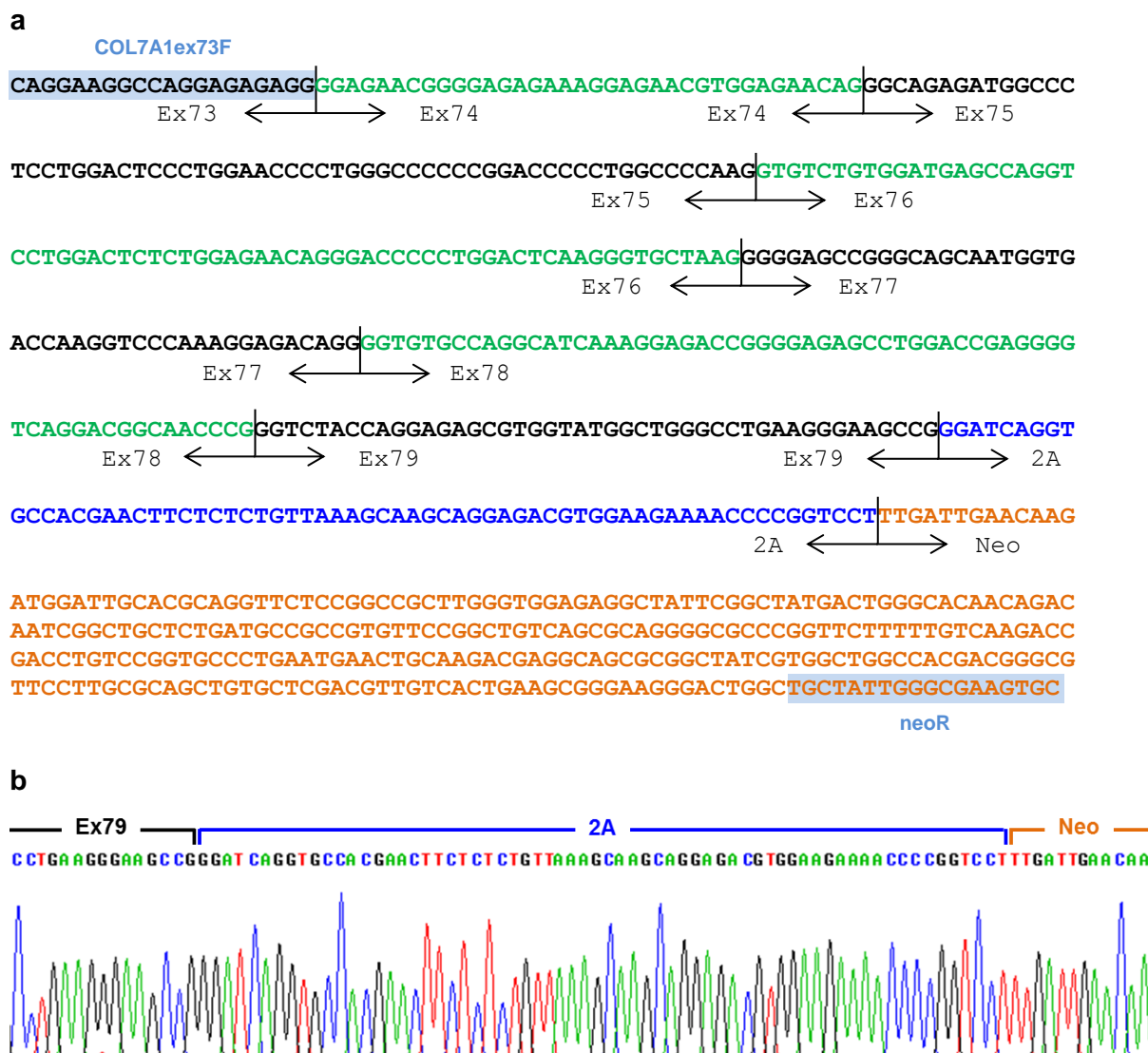


Figura 37. Transcrito de fusión *COL7A1/2A* en clones recombinantes obtenidos por transducción con el vector AAV-SA-2A-neo. (a) Secuencia del producto de RT-PCR de 699 pb. Se indican los exones del 73 al 79 del ADNc de *COL7A1* seguidos de la secuencia correspondiente al péptido 2A del teschovirus y la secuencia neo. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación aparecen sombreados en azul. (b) Parte del cromatograma que muestra la fusión en fase exón 79-2A-neo.

Como se mencionó anteriormente, la PCR llevada a cabo con la pareja de oligonucleótidos 3 y 4 (recordemos que hibridan con el gen *neo* del casete de selección y la secuencia genómica externa de la construcción de *targeting*, respectivamente) permitió determinar los clones recombinantes en los que se había producido corrección de la mutación c.6527insC. Tras secuenciar el producto de amplificación, vimos que el 94% de los clones recombinantes (32 de 34 clones) (Tabla 8) presentaban la secuencia silvestre del exón 80 bien en heterocigosis u homocigosis. En los dos clones restantes, probablemente, el sitio de entrecruzamiento entre ADN molde (brazo derecho) y el sitio diana homólogo del locus *COL7A1* se localizó entre la secuencia loxP que sigue al casete de selección y la mutación c.6527insC del exón 80, las cuales se encuentran a 198 pb.

Para analizar inequívocamente los clones en los que se apreció corrección de la mutación c.6527insC y verificar los resultados obtenidos en la PCR llevada a cabo con los oligonucleótidos 1 y 4 (recordemos que hibridan en posiciones externas a los brazos de homología) y que permitía determinar si la corrección había sido monoalélica o bialélica, se realizó una PCR más. En este caso, el oligonucleótido reverso empleado fue el 4 pero como oligonucleótido directo se usó uno específico de la secuencia genómica situada en la base del brazo de homología derecho (Figura 38a), lo que permitió amplificar tanto alelos recombinantes como no recombinantes. Los resultados obtenidos tras revisar los cromatogramas de la secuenciación del amplificado de esta última PCR (se muestran dos ejemplos en la Figura 38b) coincidían con los observados en los geles de agarosa al correr la PCR con los oligonucleótidos 1 y 4 (Figura 36a). Además, no se apreció en ningún clon modificado en heterocigosis la presencia de *indels* en el alelo no editado.

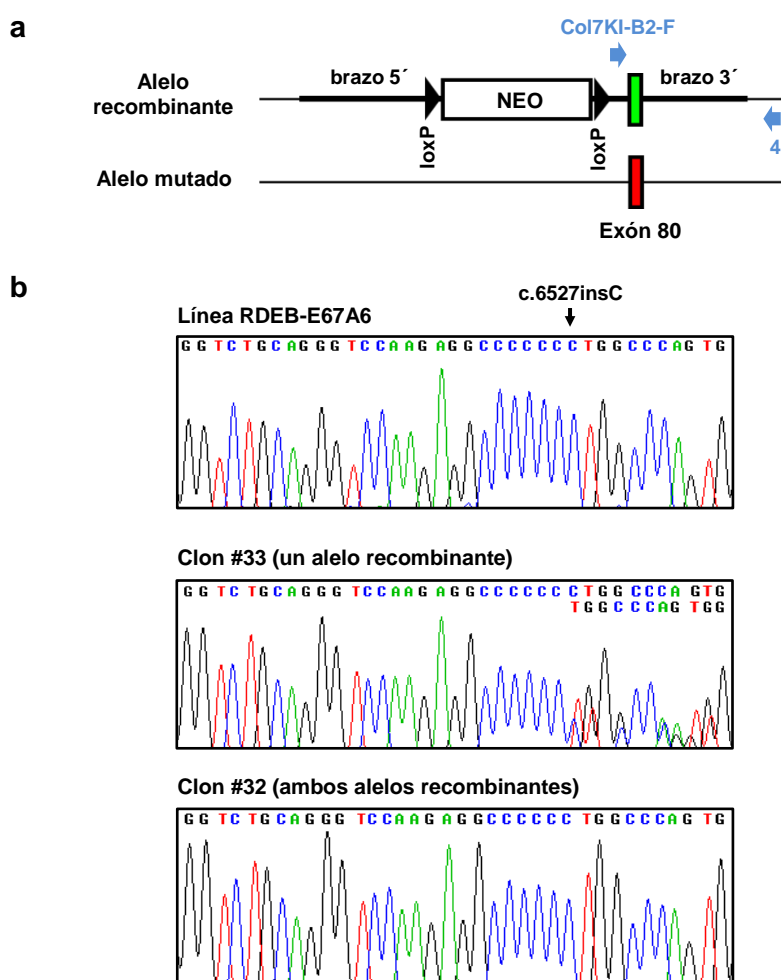


Figura 38. Comprobación de la corrección de la mutación c.6527insC por secuenciación. a) La PCR con los oligonucleótidos Col7KI-B2-F y 4 permitió la amplificación de un fragmento (conteniendo el exón 80), tanto de los alelos recombinantes (producto de amplificación de 242 pb) como de alelos en los que no se había producido evento de *targeting* (producto de amplificación de 243 pb). b) Cromatogramas que muestran la secuencia correspondiente al exón 80 de un clon corregido monoalélicamente (clon #33) y bialélicamente (clon #32). El solapamiento de cromatogramas en el clon #33 indicó corrección de la mutación c.6527insC en heterocigosis. El clon #32 presentó la secuencia silvestre del exón 80 en ambos alelos. Queratinocitos de la línea RDEB-E67A6 no transducidos presentaron, como era previsible, una serie de 7 citosinas debido a la presencia de la mutación c.6527insC en homocigosis (cromatograma superior).

La transducción de queratinocitos de la línea RDEB-E67A6 únicamente con el correspondiente vector AAVr, sin los vectores adenovirales Ad-T6 y Ad-T7, se realizó en paralelo para cada experimento de *targeting*. Un total de 98 clones control resistentes a G-418 (65 clones con el vector AAV-PGK-neo y 33 clones con el vector AAV-SA-2A-neo) (ver Tabla 8) fueron genotipados por PCR. La presencia de una única banda de 2,4 Kb en la PCR realizada con los oligonucleótidos externos a los brazos de homología (par 1 y 4) indicó la ausencia de eventos de recombinación homóloga en el locus *COL7A1* de los 98 clones analizados.

2.3.4. Genotipado por Southern blot de clones resistentes a G-418

Para confirmar los resultados obtenidos en el genotipado por PCR y analizar el número de integraciones del vector, se seleccionaron 10 de los 34 clones recombinantes y 12 de los 98 clones control y se procedió a su genotipado mediante Southern blot. La caracterización molecular de los clones mediante esta técnica fue posible gracias a que se introdujo durante la construcción de los vectores de *targeting* (PGK-neo y SA-2A-neo) un sitio diana artificial para HindIII en la base del brazo de homología 5´.

La digestión del ADN genómico de los diferentes clones con HindIII y posterior hibridación, en primer lugar, con una sonda específica del extremo 5´ del locus fuera del brazo de homología del vector (sonda 5´) (Figura 39a) permitió distinguir, inequívocamente, el alelo recombinante del alelo no recombinante por la diferencia de tamaño de la banda obtenida. En todos los clones recombinantes analizados, la utilización de la sonda 5´ dio lugar a la aparición de dos bandas: una de mayor tamaño (22 Kb) correspondiente al alelo no recombinante, y otra de menor tamaño (5 Kb) correspondiente al alelo corregido por recombinación homóloga (Figura 39b). Por el contrario, en los clones del experimento control sólo se apreció una única banda de un tamaño de 22 Kb indicativa de la ausencia de eventos de recombinación homóloga en ambos alelos (Figura 39b). Estos resultados permitieron confirmar los obtenidos por PCR.

Por otro lado, la hibridación de los genómicos digeridos con HindIII con una sonda específica del gen *neo*, gen presente en el casete de selección, permitió determinar el número de integraciones del vector en cada uno de los clones estudiados. Respecto a los clones recombinantes, 9 de los 10 clones mostraron una única banda del tamaño esperado (19 Kb), indicando la integración de una única copia del vector. Sólo un clon presentó, además de la banda de 19 Kb, una banda adicional indicativa de la integración del vector fuera del sitio diana de homología del locus *COL7A1*. Respecto a los controles (clones G-418 resistentes obtenidos por transducción con AAVr en ausencia de Ad-TALENs), todos menos uno (11 de 12) mostraron una única banda de diferente movilidad en cada uno de ellos (Figura 39b), lo que sugirió la integración al azar en diferentes localizaciones genómicas de una única copia del vector. El clon que presentaba dos bandas era indicativo, lógicamente, de la integración de la construcción de *targeting* en dos loci diferentes.

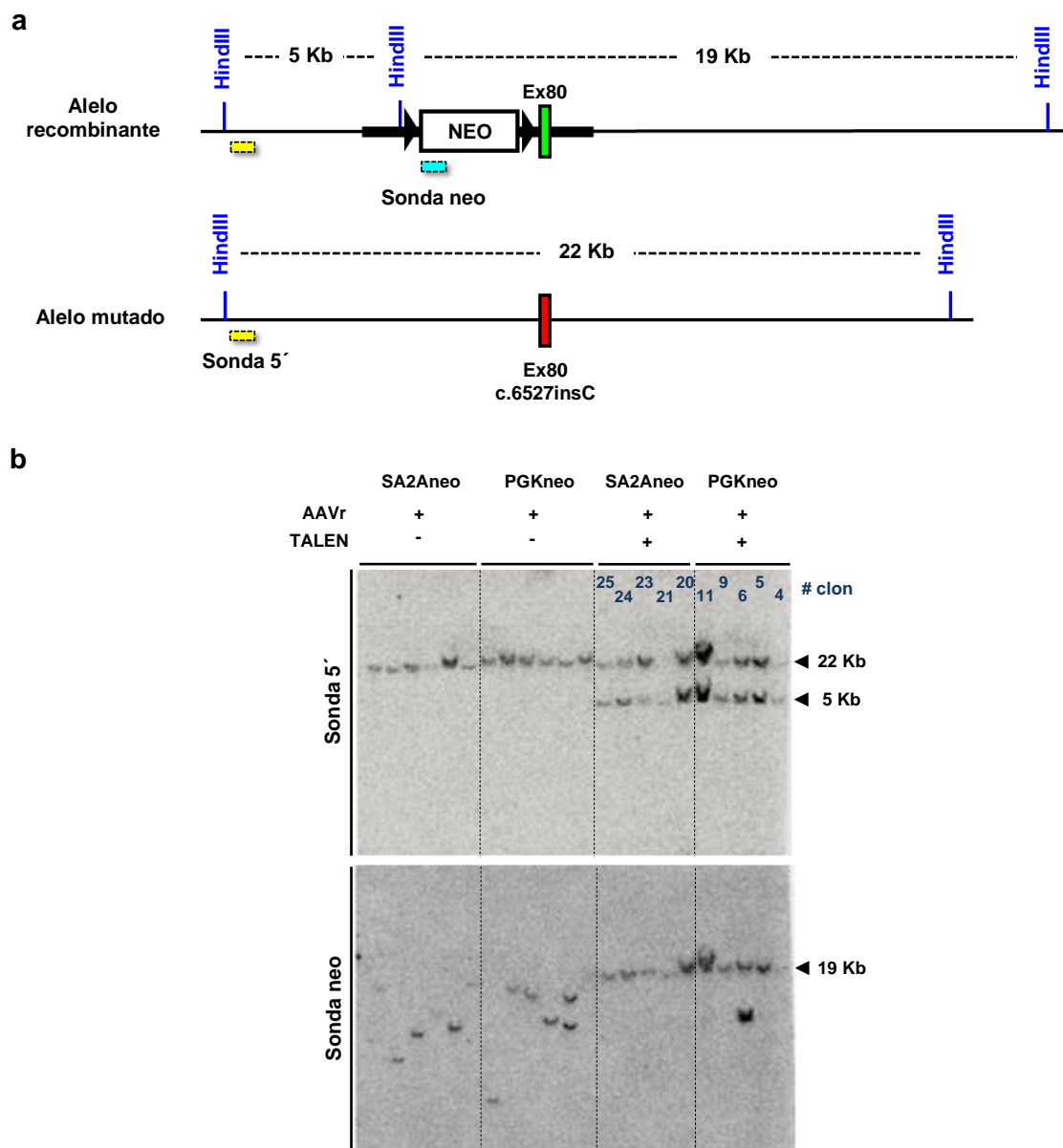


Figura 39. Análisis por Southern blot. a) Esquema explicativo de la caracterización molecular de los clones recombinantes mediante la utilización de sondas de marcaje radiactivo externas (sonda 5') e internas (sonda neo) al casete integrado. Los sitios de corte para HindIII aparecen en azul. En el vector sólo hay una diana para HindIII, situada en la base del brazo de homología 5' a tan sólo 22 pb de la secuencia loxP. b) La hibridación del ADN genómico digerido con HindIII con la sonda diseñada frente la región del locus *COL7A1* situada fuera del brazo de homología 5' (sonda 5') dio lugar a la aparición, en los clones recombinantes, de dos bandas de 22 Kb y 5 Kb correspondientes al alelo recombinante y mutado, respectivamente. Sólo la banda de 22 Kb apareció en los clones control debido a la ausencia de eventos de recombinación homóloga. La hibridación con la sonda específica del gen *neo* dio lugar a una única banda de 19 Kb en la mayoría de los clones recombinantes, lo que permitió descartar la integración de copias adicionales del vector de *targeting* fuera del sitio diana del locus *COL7A1* en estos clones. En cambio, la banda de diferente movilidad que apareció en los clones control, indicó la presencia de copias del vector en diferentes localizaciones genómicas.

2.3.5. Escisión del casete de selección de los clones recombinantes mediante expresión transitoria de la recombinasa Cre mediada por un vector adenoviral

Para evitar el silenciamiento de la expresión del gen *COL7A1* por la presencia del casete de selección en el intrón 79, como ya se apreció que ocurría en un modelo de ratón hipomorfo (Fritsch *et al.*, 2008), se eliminó dicho casete mediante transducción de los clones recombinantes con un vector adenoviral portador de la recombinasa Cre (Ad5CMV-Cre-eGFP).

Las secuencias loxP que se encuentran flanqueando el casete de selección tanto en las construcciones PGK-neo como SA-2A-neo, representan sitios de reconocimiento de la recombinasa Cre. Se espera que esta enzima, a través de la unión específica a los sitios loxP, medie la eliminación del casete de selección como resultado de la escisión del segmento génico situado entre ambas secuencias (1,8 Kb en alelos recombinantes con la construcción PGK-neo y 1,7 Kb con la construcción SA-2A-neo).

Tras la escisión del casete de selección, el alelo corregido resultante diferirá del alelo silvestre únicamente en un pequeño segmento de ≈ 80 pb. Este segmento se encontrará integrado en el intrón 79 y corresponderá a una secuencia loxP (34 pb), flanqueada por dos cortas secuencias derivadas del clonaje de las construcciones de *targeting*, e introducción de la diana artificial HindIII en la base del extremo 5'.

Antes de proceder a la transducción de una serie de clones recombinantes con el vector Ad5CMV-Cre-eGFP, se realizó un experimento para determinar las condiciones óptimas de infección, incluyendo la MOI necesaria para conseguir la escisión eficaz del casete de selección en la mayoría de las células y con la mínima toxicidad. Para ello, queratinocitos procedentes de la amplificación de un clon recombinante obtenido con la construcción de *targeting* PGK-neo y rigurosamente caracterizado por PCR y Southern blot, se transdujeron con el vector Ad5CMV-Cre-eGFP a diferentes MOIs. Posteriormente, se comprobó la eliminación del casete de selección por PCR empleando oligonucleótidos externos a los brazos de homología (par 1 y 4). Como se aprecia en la Figura 40a, la mayor parte de las células fueron eficazmente transducidas y, además, el casete de selección escindido con éxito a todas las MOIs testadas (Figura 40b). Finalmente, se decidió seleccionar la MOI de 1000 PV/célula para la infección del resto de clones con el vector adenoviral portador de la recombinasa Cre.

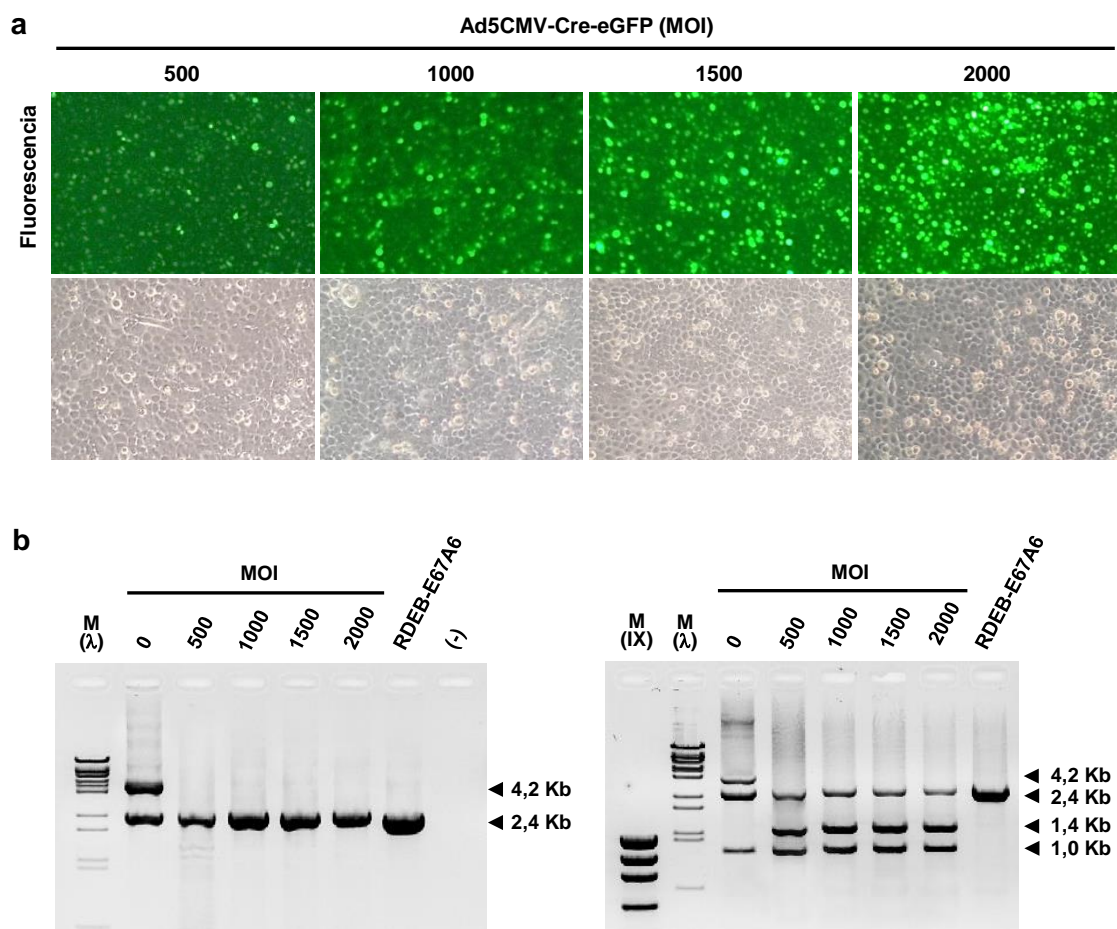


Figura 40. Transducción a diferentes MOIs con el vector adenoviral Ad5CMV-Cre-eGFP. Se transdujeron queratinocitos de un clon positivo en el genotipado por PCR y rigurosamente verificado mediante Southern blot. a) La expresión de GFP de manera generalizada tras 16 h de incubación con el vector adenoviral demostró una elevada eficacia de transducción a todas las MOIs testadas. b) Análisis por PCR para la comprobación de la escisión del casete de selección. La ausencia de la banda de 4,2 Kb (gel izquierdo) demostró la eliminación eficaz del casete de selección a todas las MOIs probadas. El patrón de bandas obtenido tras digestión con HindIII fue compatible con la escisión del casete de selección (gel derecho). Como controles se utilizaron queratinocitos del clon recombinante no transducidos (MOI: 0) y queratinocitos de la línea parental RDEB-E67A6 no editados.

Un total de 20 clones recombinantes obtenidos tanto con el vector adenoasociado de expresión constitutiva de neo (AAV-PGK-neo) como con el vector para la estrategia de trampa de *splicing* (AAV-SA-2A-neo) fueron transducidos con el vector adenoviral Ad5CMV-Cre-eGFP en las condiciones óptimas de infección establecidas en el ensayo anterior. La correcta eliminación del casete de selección se analizó, al igual que en el experimento anterior, por PCR. Los oligonucleótidos usados para la amplificación (par 1 y 4) (Figura 41a) permitieron distinguir los alelos corregidos y no recombinantes (2,4 Kb) de los alelos que contenían el casete de selección (4,2 Kb) por la diferente movilidad electroforética de las bandas en geles de agarosa. La digestión con HindIII de los productos de amplificación tras la recombinación con Cre permitió discriminar el alelo corregido (se obtienen dos bandas de 1,4 Kb y 1,0 Kb) del alelo no recombinante (banda de 2,4 Kb). En la Figura 41b se muestra la comprobación de seis clones obtenidos con el vector AAV-PGK-neo tratados con la recombinasa

Cre. En todos ellos la eliminación del casete de selección se produjo con una alta eficacia por lo que no fue necesario obtener subclones.

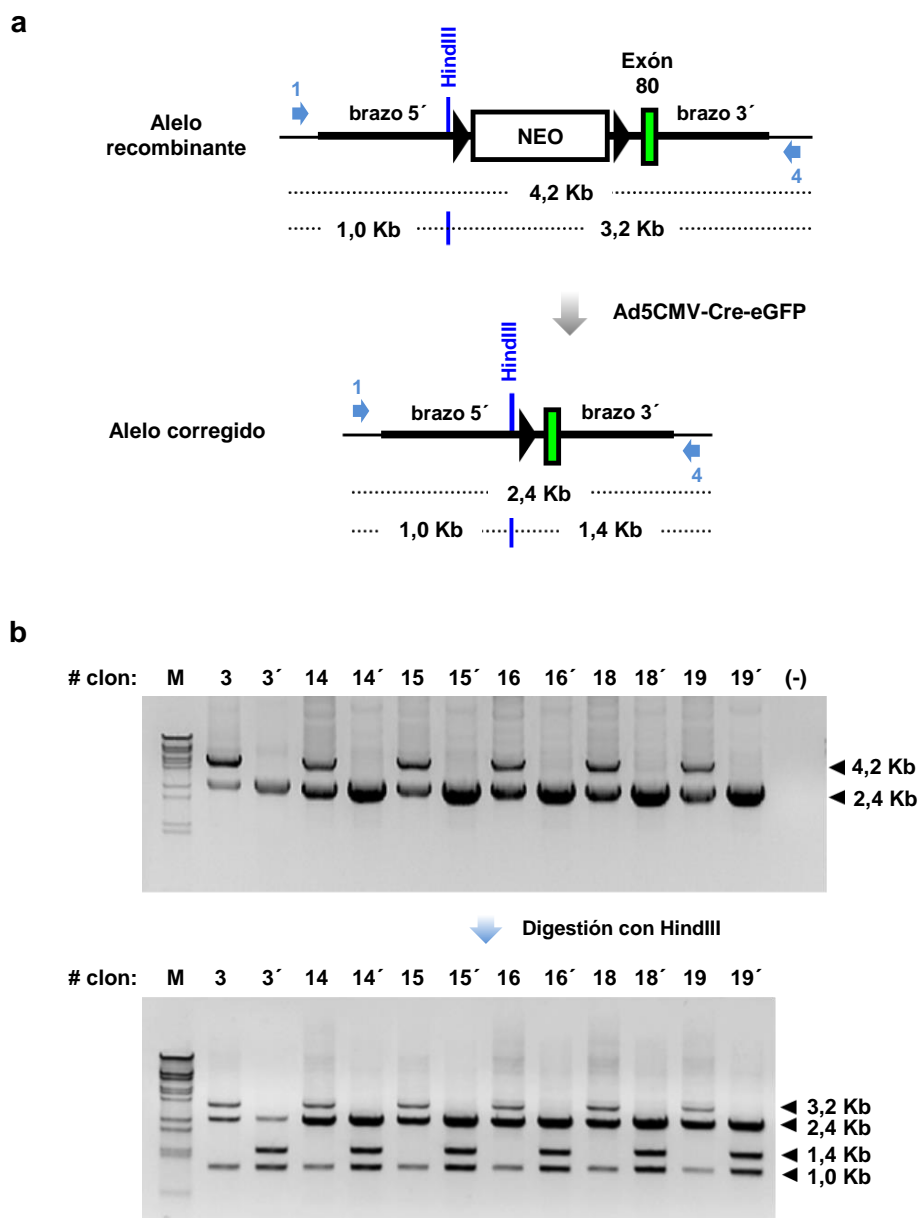


Figura 41. a) Esquema explicativo de la comprobación de la escisión del casete de selección por PCR usando oligonucleótidos externos a los brazos de homología de la construcción de *targeting*. El tamaño de los fragmentos obtenidos tras digestión con HindIII de los productos de PCR antes (alelo recombinante) y después (alelo corregido) de la expresión de la recombinasa Cre se indican debajo de cada esquema. b) Genotipado por PCR de seis clones antes (n) y después (n') del tratamiento con recombinasa Cre. La diferente movilidad de las bandas permitió distinguir, antes de la transducción con el vector Ad5CMV-Cre-eGFP, el alelo recombinante conteniendo el casete de selección (4,2 Kb) del alelo no recombinante (2,4 Kb). La desaparición de la banda de 4,2 Kb (gel superior) demostró la eliminación eficaz del casete de selección en todos los clones analizados y tratados con la recombinasa Cre. La digestión con HindIII de los productos de amplificación anteriores permitió discriminar el alelo corregido (se obtienen dos bandas de 1,4 Kb y 1,0 Kb) del alelo no recombinante (banda de 2,4 Kb). M: marcador de peso molecular Lambda DNA/BstEII.

2.3.6. Análisis de expresión de los clones corregidos por RH

El estudio de la expresión de los clones corregidos por recombinación homóloga se realizó mediante RT-PCR. El análisis se llevó a cabo con 20 clones recombinantes previamente tratados con la recombinasa Cre y rigurosamente genotipados para la verificación de la correcta eliminación del casete de selección. 19 de los 20 clones presentaban corrección del exón 80, y un clon mantenía la mutación c.6527insC debido a que la recombinación entre el brazo 3' del vector de *targeting* y la secuencia homóloga del locus *COL7A1* tuvo lugar en la región comprendida entre el casete de selección y el exón 80. Este clon fue tratado igualmente con la recombinasa Cre para la eliminación del casete de selección, e incluido en el análisis (clon 17 en la Figura 42). Como controles se usaron queratinocitos procedentes de un donante sano (WT), de un donante heterocigoto para la mutación c.6527insC (HT) y queratinocitos de la línea RDEB-E67A6 no editados (A6).

El análisis de RT-PCR mostró expresión de *COL7A1* en los 19 clones recombinantes con corrección del exón 80, antes y después del tratamiento con Cre. El nivel de expresión en todos los casos fue mayor que el observado en la línea parental no editada RDEB-E67A6 (Figura 42a). Por el contrario, el clon no corregido (clon 17) mostró niveles de expresión comparables a los queratinocitos RDEB-E67A6 previa y posteriormente a la escisión del casete de selección (clon 17 señalado con subrayado en la Figura 42a).

La secuenciación de los productos de amplificación de la RT-PCR mostró que, previamente a la eliminación del casete de selección, el alelo no corregido (presencia de la mutación c.6527insC) era el alelo expresado principalmente. En cambio, después de la escisión del casete, tanto el alelo corregido (serie de 6 citosinas en el sitio de mutación) como el alelo no corregido (serie de 7 citosinas) se expresaban equitativamente. Como era previsible, los clones con ambos alelos corregidos obtenidos con el vector AAVr basado en la estrategia de trampa de *splicing* (clon 29, 32 y 34 marcados con asterisco en la Figura 42a), mostraron una única banda del tamaño esperado una vez tratados con Cre. Esta banda se correspondió con la observada en los clones con un único alelo corregido. Curiosamente, la banda de RT-PCR obtenida antes del tratamiento con Cre de estos clones (ambos alelos recombinantes), resultó tener un tamaño mayor al que se esperaría en la amplificación del ADNc de *COL7A1* con los oligonucleótidos empleados en el análisis de expresión. El análisis de secuenciación reveló que esta banda correspondía a la fusión de la secuencia del casete de resistencia neo y la secuencia del ADNc de *COL7A1*. El clon 29 presentaba antes del tratamiento con Cre tanto la banda de *COL7A1* como la banda de fusión debido, probablemente, a la mezcla de dos poblaciones celulares.

El producto de amplificación correspondiente al alelo corregido (serie de 6 citosinas en el exón 80) y al alelo mutado (serie de 7 citosinas) pudo ser fácilmente diferenciado mediante digestión de los productos de la RT-PCR con la enzima de restricción BglI ya que la inserción de la citosina en la posición c.6527insC elimina la diana para BglI en este punto (Figura 42b). El patrón de digestión con BglI confirmó que, previamente a la eliminación del casete, la banda principal de RT-PCR observada en todos los clones recombinantes (clones con un alelo recombinante con corrección de la mutación c.6527insC) correspondía a la transcripción del alelo mutado. Tras la escisión del casete de

selección, los productos de la digestión con BglI verificaron los resultados de la secuenciación: la expresión del alelo corregido y del alelo mutado era equitativa (Figura 42c). Como era de esperar, el patrón de digestión del clon 17 antes y después del tratamiento con Cre era consistente con la expresión del alelo no corregido ya que en este clon la recombinación homóloga no había dado lugar al reemplazamiento del exón 80 mutado por el corregido.

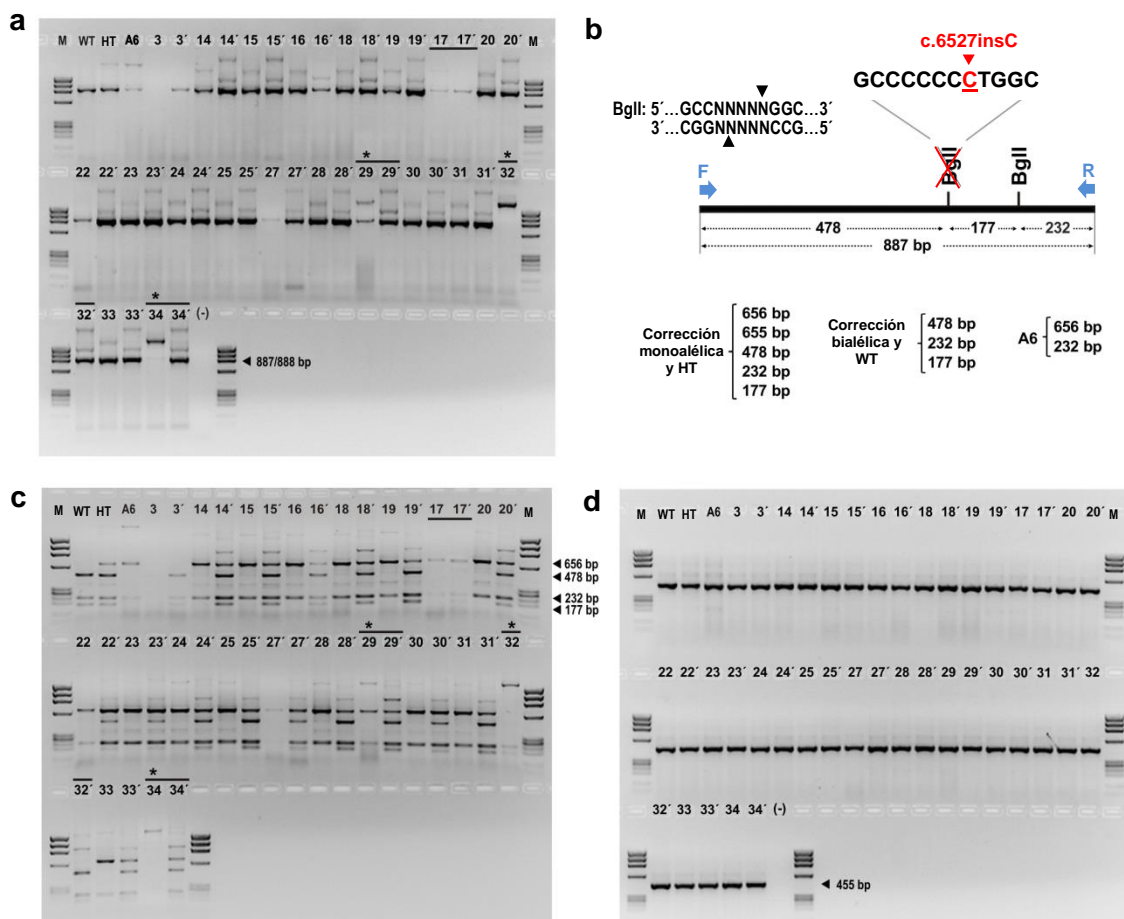


Figura 42. Análisis por RT-PCR de la expresión del gen *COL7A1* en clones corregidos por recombinación homóloga. a) Diecinueve clones recombinantes con corrección de la mutación c.6527insC se analizaron antes y después de la transducción con el vector Ad5CMV-Cre-eGFP. El número de cada clon se indica encima de cada carril, (n) antes y (n') después del tratamiento con la recombinasa Cre. El clon 17 (clon recombinante no corregido) está indicado con subrayado. Los clones bialélicamente recombinantes (29, 32, 34) están marcados con asterisco. Queratinocitos humanos normales (secuencia silvestre del exón 80 en ambos alelos) (WT), y portadores de la mutación c.6527insC en heterocigosis (HT) fueron utilizados como control de los niveles fisiológicos de expresión del gen *COL7A1*. El patrón de restricción (b) que se obtiene tras digestión con BglI de las bandas de RT-PCR correspondiente al transcrito de alelos silvestres (WT) y mutados (c.6527insC) permite deducir los alelos presentes en los veinte clones recombinantes incluidos en el análisis de expresión (c). d) La expresión del gen constitutivo *GAPDH* fue analizada como control de carga.

Para cuantificar rigurosamente la expresión de los alelos corregidos y no corregidos antes y después de la delección del casete de selección mediada por la recombinasa Cre, se clonaron en el plásmido pGEM-T los productos de amplificación de la RT-PCR correspondientes a los clones HDR18 (un alelo recombinante con el vector AAV-PGKneo), HDR33 (un alelo recombinante con el vector AAV-SA-2A-neo) y HDR32 (ambos alelos recombinantes con el vector AAV-SA-2A-neo) y se analizaron, aproximadamente, 10 colonias para cada clon (Tabla 9).

Antes del tratamiento con Cre, se encontró únicamente expresión del transcrito correspondiente al alelo no recombinante en el clon HDR18, mayoritariamente transcritos correspondientes al alelo no recombinante en el clon HDR33, y sólo transcritos de fusión (neo-COL7A1) en el clon HDR32. Después de la eliminación del casete de selección, los clones con un alelo recombinante (HDR18 y HDR33) expresaron tanto el alelo no recombinante (7 citosinas) como el alelo corregido (6 citosinas) y, como era de esperar, sólo se apreció expresión del alelo corregido en el clon HDR32.

# clon	transcrito 1 / transcrito 2	Colonias analizadas	Nº colonias transcrito 1	Nº colonias transcrito 2
PGK-neo HDR18	no recombinante/recombinante	10	10	0
PGK-neo HDR18/Cre	no recombinante/corregido	9	6	3
SA-2A-neo HDR32	recombinante/recombinante	8	8 (fusión Neo-COL7A1)	
SA-2A-neo HDR32/Cre	corregido/corregido	10	10	
SA-2A-neo HDR33	no recombinante/recombinante	10	9	1 (fusión Neo-COL7A1)
SA-2A-neo HDR33/Cre	no recombinante/corregido	9	4	5

Tabla 9. Cuantificación de los transcritos del gen *COL7A1* de tres clones corregidos por recombinación homóloga. Los productos de la RT-PCR fueron clonados en el plásmido pGEM-T y posteriormente secuenciados. Se analizó un clon recombinante monoalélico obtenido con el vector AAV-PGK-neo (HDR18), un clon recombinante monoalélico obtenido con el vector AAV-SA-2A-neo (HDR33) y un clon recombinante bialélico obtenido con el vector AAV-SA-2A-neo (HDR32).

2.4. Edición del gen COL7A1 mediante el mecanismo de reparación de extremos no homólogos (NHEJ)

Como ya se ha comentado, la reparación de las roturas de doble hebra puede llevarse a cabo por dos vías principales: la vía de la recombinación homóloga y la vía de la recombinación no homóloga (NHEJ). Hasta ahora, en este trabajo se ha mostrado la corrección de la mutación c.6527insC en queratinocitos de la línea RDEB-E67A6 por recombinación homóloga. Para ello, ha sido necesario el empleo de nucleasas TALEN (vehiculizadas en vectores adenovirales) en combinación con un ADN molde (empaquetado en vectores adenoasociados).

A continuación se abordará la edición del gen *COL7A1* por la vía de reparación de NHEJ. Esta estrategia, a diferencia de la edición por recombinación homóloga, se puede lograr mediante la introducción únicamente de nucleasas en las células diana. Las roturas de doble cadena generadas por las nucleasas serán reparadas predominantemente mediante NHEJ, vía de reparación que conlleva frecuentemente la generación de deleciones e inserciones (*indels*) en el sitio de corte. Algunos de los *indels* pueden constituir modificaciones con potencial correctivo si resultan en la recuperación del marco de lectura del gen diana.

Debido a la elevada actividad mostrada por la pareja de nucleasas TALEN T6 y T7 (porcentaje de corte estimado en ensayo de CEL-1 del 55,1%, Figura 33a) se consideró factible la edición del gen *COL7A1* mediante el mecanismo de NHEJ. En esta parte del trabajo se analizará un número significativo de clones RDEB-E67A6 con diferentes *indels* en el sitio diana de corte de la pareja T6/T7 y se determinará cómo afecta la presencia de los mismos a la expresión del gen *COL7A1*.

2.4.1. Transducción de queratinocitos de la línea RDEB-E67A6 con los vectores adenovirales Ad-T6 y Ad-T7, obtención de clones y análisis de *indels*

Para conseguir clones de queratinocitos con *indels* en el exón 80 del gen *COL7A1*, células de la línea RDEB-E67A6 se transdujeron con los vectores adenovirales para la expresión de las nucleasas TALEN T6 y T7 a una MOI de 1000 PV/célula y se aislaron clones individuales por dilución límite. Un total de 113 clones fueron expandidos y analizados para determinar los *indels* presentes en cada uno de los clones. Este análisis se llevó a cabo por secuenciación del producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos F1 y R que permiten amplificar la totalidad del intrón 79 y del exón 80 del locus *COL7A1*. La secuencia correspondiente a cada alelo en los cromatogramas que presentaban picos solapados se determinó con la aplicación web Poly Peak Parser (Hill *et al.*, 2014). No obstante, las secuencias derivadas de este análisis fueron posteriormente verificadas manualmente. De los 113 clones analizados, 30 presentaron *indels* en la zona de corte de las nucleasas, lo que supone un 26,5% de clones modificados. Aunque se encontraron 19 tipos de *indels* diferentes, algunos de ellos aparecían con una elevada frecuencia: once clones presentaron la deleción de un único par de bases (c.6512delG), cuatro clones presentaron una deleción de 18 pb ($\Delta 18$) y dos clones una deleción de 19 pb ($\Delta 19$). Estas mutaciones recurrentes se encontraron tanto en heterocigosis como homocigosis y/o en clones heterocigotos compuestos (Tabla 10).

	Intrón 79	Exón 80	Intrón 80	Nº de clones	
silvestre	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGGGTCTGCAGGGTCCAAGAGGCCCCCTGGCCCAAGTGGT	...GAGTACCCAAG...		HT	HM
		T6 T7			
Δ1	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGGGTCTGCAGG--TCCAAGAGGCCCCCTGGCCCAAGTGGT	...GAGTACCCAAG...		8	1
Δ1,+1	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGGGTCTGCAGGAGGTCCAAGAGGCCCCCTGGCCCAAGTGGT	...GAGTACCCAAG...		1	0
Δ2	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGGGTCTGCAGGGT--AAGAGGCCCCCTGGCCCAAGTGGT	...GAGTACCCAAG...		1	0
Δ2	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGGGTCTGCAG--TCCAAGAGGCCCCCTGGCCCAAGTGGT	...GAGTACCCAAG...		1	0
Δ6,+3	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGGGTCTGC--GGG--CAAGAGGCCCCCTGGCCCAAGTGGT	...GAGTACCCAAG...		1	0
Δ5	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGGGTCTGCAG---AAGAGGCCCCCTGGCCCAAGTGGT	...GAGTACCCAAG...		1	0
Δ5	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGGGTCTGCA---CAAGAGGCCCCCTGGCCCAAGTGGT	...GAGTACCCAAG...		1	0
Δ6	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGGGTCTGCA-----CAAGAGGCCCCCTGGCCCAAGTGGT	...GAGTACCCAAG...		0	1
Δ6	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGGGTCTGCA-----AAGAGGCCCCCTGGCCCAAGTGGT	...GAGTACCCAAG...		0	1
Δ7	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGGGTCTGCA-----AGAGGCCCCCTGGCCCAAGTGGT	...GAGTACCCAAG...		1	0
Δ8	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGGGTCTGCAG-----AGGCCCCCTGGCCCAAGTGGT	...GAGTACCCAAG...		1	0
Δ18	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGGG-----CCCCCTGGCCCAAGTGGT	...GAGTACCCAAG...		3	1
Δ19	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGG-----CCCCCTGGCCCAAGTGGT	...GAGTACCCAAG...		1	0
Δ34	...GATTGAGGCTCATCAGTGCC-----CCCCCTGGCCCAAGTGGT	...GAGTACCCAAG...		1	0
Δ40	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGGGTCTGCA-----AG--	...GAGTACCCAAG...		1	0
Δ42	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAG-----TACCCAAG...			1	0
Alelo 1: Δ43	...GA-----CAAGAGGCCCCCTGGCCCAAGTGGT	...GAGTACCCAAG...		1	
Alelo 2: Δ16	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGGGTCTGCAGGGT-----GCCCCAGTGGT	...GAGTACCCAAG...			
Alelo 1: Δ19	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGG-----CCCCCTGGCCCAAGTGGT	...GAGTACCCAAG...		1	
Alelo 2: Δ1	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGGGTCTGCAGG--TCCAAGAGGCCCCCTGGCCCAAGTGGT	...GAGTACCCAAG...			
Alelo 1: Δ20	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATG-----AGGCCCCCTGGCCCAAGTGGT	...GAGTACCCAAG...		1	
Alelo 2: Δ1	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGGGTCTGCAGG--TCCAAGAGGCCCCCTGGCCCAAGTGGT	...GAGTACCCAAG...			

Tabla 10. *Indels* presentes en clones de queratinocitos RDEB-E67A6 transducidos con los vectores adenovirales Ad-T6 y Ad-T7. Treinta de los 113 clones analizados presentaron *indels* en el sitio diana de corte de la pareja de nucleasas. Se han identificado deleciones (representadas por guiones) desde 1 pb hasta 43 pb. El número de clones heterocigotos (HT) y homocigotos (HM) encontrados para un determinado *indel* se muestra a la derecha de la tabla. Los intrones 79 y 80 aparecen sombreados en gris y la secuencia correspondiente al exón 80 se muestra en azul. En rojo se indican las secuencias consenso de *splicing* AG (sitio aceptor) y GT (GU en el pre ARNm, sitio donador). El sitio de unión de la TALEN T6/T7 se indica con líneas verdes.

2.4.2. Análisis de la expresión del ARNm de COL7A1 en clones editados mediante el mecanismo de NHEJ

Una vez identificados los clones con *indels*, se seleccionó un clon de cada mutación o combinación de mutaciones (en el caso de clones heterocigotos compuestos) y se analizó la expresión del gen COL7A1 por RT-PCR. Se amplificó la región comprendida entre los exones 73 y 88 del ADNc. Queratinocitos humanos procedentes de un donante sano (secuencia silvestre del exón 80 en ambos alelos, WT) y de un donante heterocigoto para la mutación c.6527insC (HT), se incluyeron en el análisis como control de los niveles fisiológicos de expresión del gen COL7A1. Como se puede apreciar en la Figura 43, en la mayoría de los clones con *indels* el nivel de expresión fue claramente superior al de la línea parental no editada RDEB-E67A6 independientemente de que la mutación/es presente/s en el clon resultara o no en la recuperación del marco de lectura.

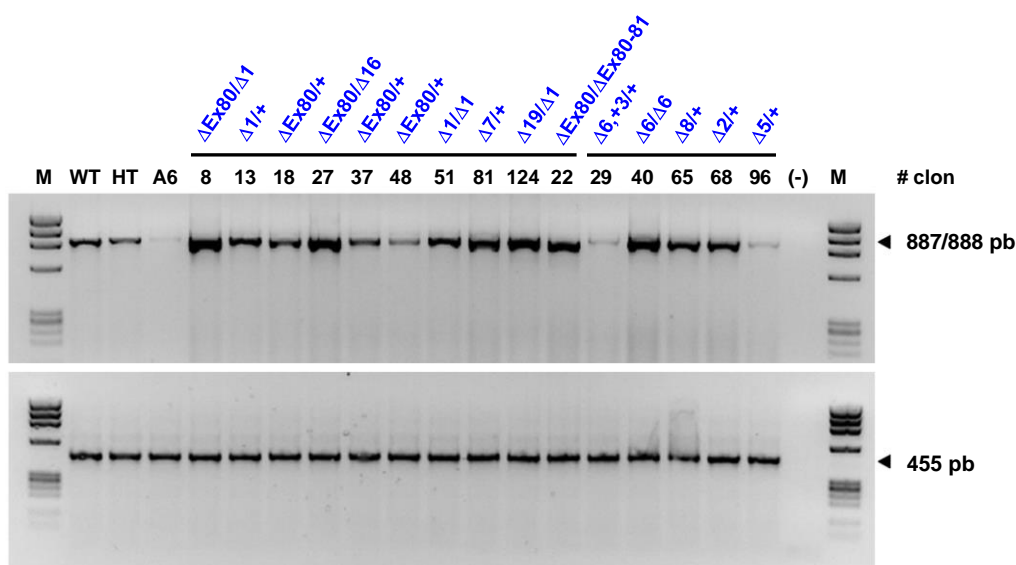


Figura 43. Análisis de expresión del gen *COL7A1* mediante RT-PCR de clones RDEB-E67A6 con *indels* en el sitio diana de corte de la pareja de nucleasas T6/T7 y generados por el mecanismo de reparación de NHEJ. Un clon representativo de cada mutación o combinación de mutaciones fue incluido en el análisis junto con los controles WT (queratinocitos normales), HT (queratinocitos heterocigotos para la mutación c.6527insC) y A6 (queratinocitos de la línea RDEB-E67A6 no editados). En comparación con queratinocitos de la línea RDEB-E67A6, se apreciaron altos niveles de expresión del transcrito de *COL7A1* tanto en clones con *indels* que causan recuperación del marco de lectura (clones 8, 13, 18, 27, 37, 48, 51, 81, 124 y 22) como en clones con modificaciones que no resultan en la restauración del marco de lectura (clones 29, 40, 65, 68 y 96). Encima del número de cada clon se muestra la modificación presente en los transcritos correspondientes a cada alelo. El símbolo + hace referencia a transcritos no editados. La expresión del gen constitutivo *GAPDH* (455 pb) fue analizada como control de carga. M: marcador de peso molecular IX.

Tras esta observación, los productos de RT-PCR se secuenciaron para analizar los transcritos del gen *COL7A1*. La lectura de los cromatogramas reveló la presencia de transcritos correspondientes al alelo editado y no editado en los clones modificados monoalélicamente. En el caso de los clones cuyos dos alelos habían sido modificados, se pudo apreciar y diferenciar claramente la secuencia correspondiente al transcrito de cada alelo. No obstante, para determinar inequívocamente las mutaciones de los transcritos sintetizados en los clones editados y cuantificar la expresión relativa de ambos alelos, se procedió al clonaje de los productos de la RT-PCR en el vector pGEM-T y posterior secuenciación de los mismos. Este análisis resultó especialmente interesante en los clones editados monoalélicamente debido a la inesperada expresión del alelo no editado. La lectura de las secuencias reveló, como ya anticipó la secuenciación directa del *pool* de los productos de RT-PCR, la expresión tanto de los alelos no editados como de los alelos con *indels* compatibles con la recuperación del marco de lectura. Además, la expresión de dichos alelos se producía en proporciones similares. Asimismo, el tipo de modificación que hipotéticamente permitiría restaurar el marco de lectura no parece influir: se aprecian ratios similares de expresión de transcritos con deleciones intraexónicas como con deleción del exón 80 (Tabla 11).

# clon	transcrito 1/transcrito 2	Colonias analizadas	Nº colonias transcrito 1	Nº colonias transcrito 2
NHEJ-8	Δ Ex80/ Δ 1	15	8	7
NHEJ-13	Δ 1/no editado	16	9	7
NHEJ-18	Δ Ex80/no editado	14	6	8
NHEJ-22	Δ Ex80/ Δ Ex80-81	19	11	8
NHEJ-27	Δ Ex80/ Δ 16	11	4	7
NHEJ-37	Δ Ex80/no editado	17	7	10
NHEJ-48	Δ Ex80/no editado	16	9	7
NHEJ-51	Δ 1/ Δ 1	14	14	
NHEJ-81	Δ 7/no editado	18	5	13
NHEJ-124	Δ 19/ Δ 1	11	5	6

Tabla 11. Identificación de las modificaciones de los transcritos del gen *COL7A1* de clones RDEB-E67A6 editados por NHEJ y cuantificación relativa de la expresión de ambos alelos. El producto de amplificación del ADNc de *COL7A1* (exones 73 al 88) se clonó en el vector pGEM-T y posteriormente se procedió a la secuenciación de colonias individuales.

La correspondencia en cada clon de los *indels* encontrados en el locus *COL7A1* a nivel de ADN y las modificaciones observadas a nivel transcripcional se puede apreciar en la Tabla 12.

Para corregir el efecto de la mutación c.6527insC, responsable de la aparición de un codón de terminación prematuro como consecuencia de la alteración del marco de lectura del gen *COL7A1*, es necesario que los cambios en la secuencia codificante se produzcan inmediatamente antes de la mutación para que el número de aminoácidos afectados hasta la recuperación del marco de lectura, que se producirá en la serie de 7 citosinas, sea el mínimo posible. Además de esta estrategia enfocada a la recuperación del marco de lectura, la generación de *indels* que impliquen la eliminación de las señales de procesamiento de *splicing* resultarían muy interesantes ya que conducirían, previsiblemente, a la síntesis de transcritos carentes del exón 80. La pareja de TALENs T6/T7 por su elevada actividad nucleasa y sitio diana de corte (al inicio del exón 80) resultó ideal para lograr ambas estrategias.

Como se puede apreciar en la Tabla 11, se han conseguido aislar clones con *indels* que han resultado en la expresión de transcritos de *COL7A1* carentes del exón 80 o bien con delecciones compatibles con la restauración del marco de lectura.

Los *indels* que se han identificado en los clones editados por NHEJ y que son compatibles con la recuperación del marco de lectura, han consistido en delecciones intra-exónicas de 1, 7, 16 y 19 pb. Estas delecciones implican cambios limitados en la secuencia de aminoácidos correspondiente al exón 80 (Figura 44). El *indel* que ha aparecido con más frecuencia (Δ 1 pb), conlleva la modificación de cuatro aminoácidos: valina - glutamina - ácido glutámico - alanina en vez de la secuencia silvestre glicina -prolina - arginina - glicina (Figura 44). En cambio, las delecciones que incluyen la señal de procesamiento del intrón presentes en 5' (Δ 20, Δ 34, Δ 43) o 3' (Δ 40, Δ 42) de la secuencia del exón 80 (ver Tabla 12) dan lugar a transcritos de colágeno truncados que carecen de la secuencia completa correspondiente a los 12 aminoácidos que codifica el exón 80. Curiosamente, la delección intra-

exónica de 18 pb que presentaba el clon 22 en homocigosis originaba transcritos sin exón 80 pero también transcritos carentes del exón 80 y 81 (Tabla 12) y, además, ambos se expresaban en proporciones similares (Tabla 11).

Las deleciones intra-exónicas que se identificaron a nivel de ADN y que no implicaban la restauración del marco de lectura ($\Delta 2$, $\Delta 6+3$, $\Delta 5$, $\Delta 6$ y $\Delta 8$) aparecían, exactamente, en los transcritos sintetizados (Tabla 12).

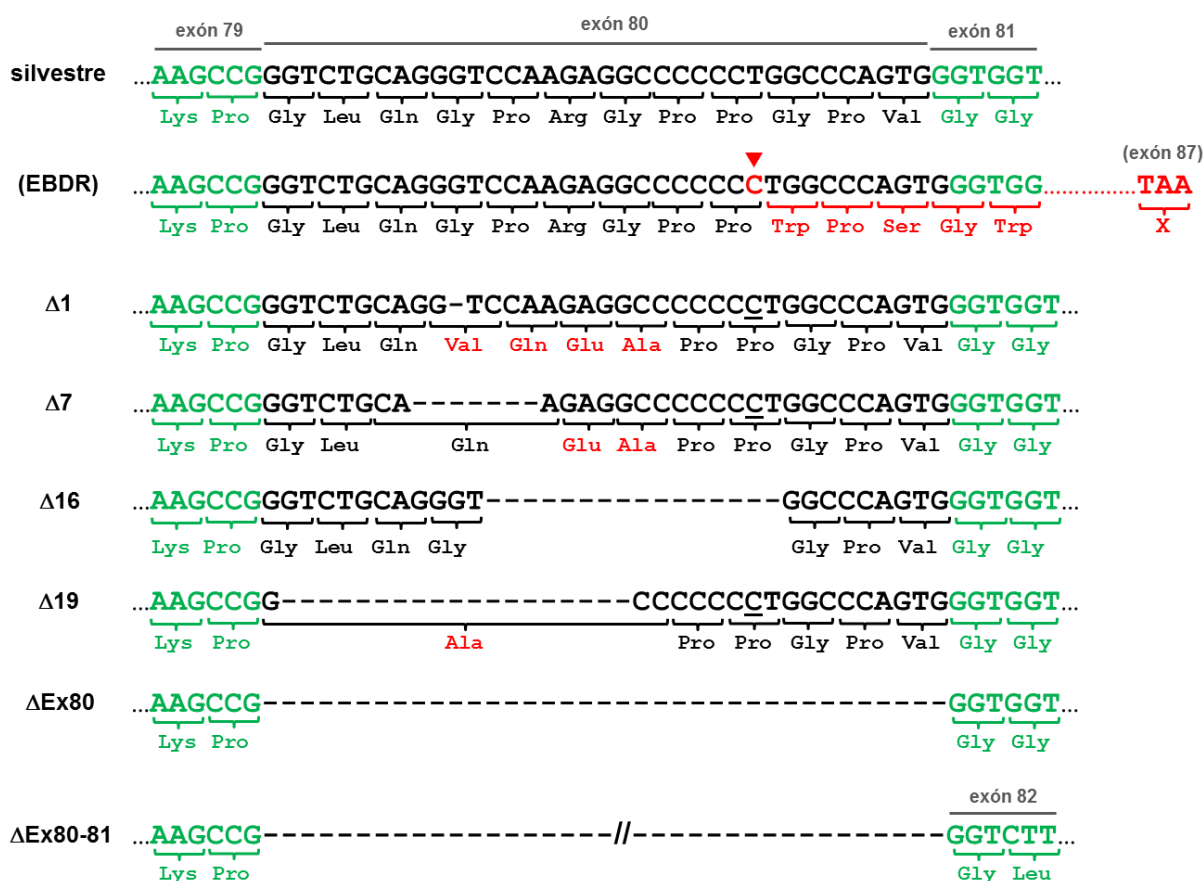


Figura 44. Secuencias a nivel del exón 80 correspondientes a los transcritos del gen COL7A1 sintetizados en clones RDEB-E67A6 con *indels* compatibles con la recuperación del marco de lectura. Se indica, debajo de cada transcrito, los cambios que se producen en la secuencia aminoacídica del colágeno VII con respecto a la secuencia silvestre. También se muestran las alteraciones que conlleva la mutación c.6527insC (señalada por un triángulo rojo) presente en casi el 50% de los pacientes EBDR en población española. La inserción de una citosina en la posición 6527 de la secuencia codificante provoca un cambio en la pauta de lectura del ARN mensajero que conlleva a la aparición de un codón de parada prematuro (TAA) a la altura del exón 87.

De los 19 tipos de *indels* diferentes que se identificaron en el genotipado, 10 resultaron en la expresión de transcritos con corrección del marco de lectura (incluyendo los transcritos carentes del exón 80). Considerando el número de clones que presentaba cada tipo de *indel* o combinación de *indels*, implica que un elevado porcentaje de los clones genotipados en total (20%), podrían, como se analizará a continuación junto con los clones editados por RH, resultar en la recuperación de la síntesis de la proteína colágeno VII.

Tabla 12. Modificaciones halladas en el ADNc de 15 clones representativos con *indel*s en heterocigosis (HT), homocigosis (HM) o combinación de *indel*s (heterocigotos y homocigotos) en la secuencia del locus COL7A1 a nivel del exón 80 así como las modificaciones encontradas a nivel transcripcional.

Tabla 12. Modificaciones halladas en el ADNc de 15 clones representativos con *indel*s en heterocigosis (HT), homocigosis (HM) o combinación de *indel*s (heterocigotos y homocigotos) en la secuencia del locus COL7A1 a nivel del exón 80 así como las modificaciones encontradas a nivel transcripcional.

2.5. Recuperación de la expresión de colágeno VII en clones editados por RH y NHEJ

El estudio de la expresión de colágeno VII se realizó por Western blot. Se analizaron clones corregidos por RH y por NHEJ.

Dentro de los clones corregidos por RH, se eligieron para el estudio tanto clones obtenidos con el vector de expresión constitutiva de neo (clones 3, 4, 6 y 51) como obtenidos con el vector basado en la estrategia de trampa de *splicing* (clones 32 y 33). Además, el análisis de los extractos proteicos se realizó antes y después del tratamiento con Cre con el fin de comparar el efecto de la escisión del casete de selección en la expresión de colágeno VII.

El análisis por Western blot antes del tratamiento con Cre reveló la ausencia total de colágeno VII en todos los clones recombinantes estudiados independientemente del vector AAVr empleado (Figura 45a). Este resultado fue totalmente consistente con la falta de expresión del alelo corregido que se observó por RT-PCR previamente a la eliminación del casete de selección (Figura 42). Sin embargo, después del tratamiento con la recombinasa Cre todos los clones mostraron expresión de colágeno VII a niveles comparables a los observados en el control positivo (queratinocitos primarios humanos normales) (Figura 45a), lo que indicó que la escisión del casete de selección se consiguió eficazmente en la práctica totalidad de las células y constituye un paso fundamental para permitir la expresión de proteína.

Como era de esperar, en queratinocitos de la línea RDEB-E67A6 no editados y queratinocitos del clon 17 (clon recombinante sin corrección de la mutación c.6527insC) no se detectó expresión de colágeno VII (Figura 45a).

Respecto a los clones editados por NHEJ, se analizaron todos aquellos que presentaron *indels* coherentes con la restauración del marco de lectura ($\Delta 1$, $\Delta 7$, $\Delta 16$ y $\Delta 19$), o bien resultaron en la síntesis de transcritos de *COL7A1* carentes del exón 80 ($\Delta 18$, $\Delta 20$, $\Delta 34$, $\Delta 40$, $\Delta 42$ y $\Delta 43$). También se estudiaron clones con mutaciones no compatibles con la recuperación del marco de lectura ($\Delta 6$ ins3, $\Delta 2$, $\Delta 5$, $\Delta 6$ y $\Delta 8$).

El análisis por Western blot reveló expresión de proteína en todos los clones con síntesis de transcritos con recuperación del marco de lectura o carentes del exón 80 (clones 8, 13, 18, 22, 27, 37, 48, 51, 81 y 124), siendo el tamaño estimado de las proteínas sintetizadas, bien mutadas o truncadas, muy similar a la correspondiente proteína silvestre de colágeno VII (290 KDa). En todos los clones se apreció la aparición de una única banda cuya intensidad dependió del tipo de *indel* presente en el clon y del número de alelos editados. Los clones que mostraron una pronunciada sobreexpresión de proteína en comparación con los niveles fisiológicos marcados por los queratinocitos humanos normales o corregidos por RH, presentaban *indels* que conducían a la re-expresión de colágeno VII en ambos alelos, bien en homocigosis ($\Delta 1/\Delta 1$, $\Delta 18/\Delta 18$) o heterocigosis compuesta ($\Delta 19/\Delta 1$, $\Delta \text{Ex}80/\Delta 1$, $\Delta \text{Ex}80/\Delta 16$). Relevantemente, los clones editados monoalélicamente con síntesis de transcritos carentes del exón 80 (clones 18, 37 y 48) mostraron expresión de colágeno VII a niveles fisiológicos.

En los clones con *indels* incompatibles con la corrección del marco de lectura (clones 29, 40, 65, 68 y 96) no se detectó expresión de colágeno VII (Figura 45a).

Finalmente, para complementar los resultados de expresión derivados del análisis por Western blot, se procedió a la detección de colágeno VII por inmunofluorescencia. Se analizaron clones corregidos por NHEJ que presentaban una notable sobreexpresión de proteína (clon 8, 27, 51 y 124) y un clon representativo corregido por RH (clon 3 post-tratamiento con Cre) como control de los niveles de expresión fisiológicos de colágeno VII. Como se distingue en la Figura 45b, la intensidad de la fluorescencia fue consistente con la intensidad de las bandas obtenidas en Western blot. Una fuerte tinción citoplásmica se detectó en los queratinocitos procedentes de los clones editados por NHEJ en comparación con los queratinocitos del clon corregido monoalélicamente por RH.

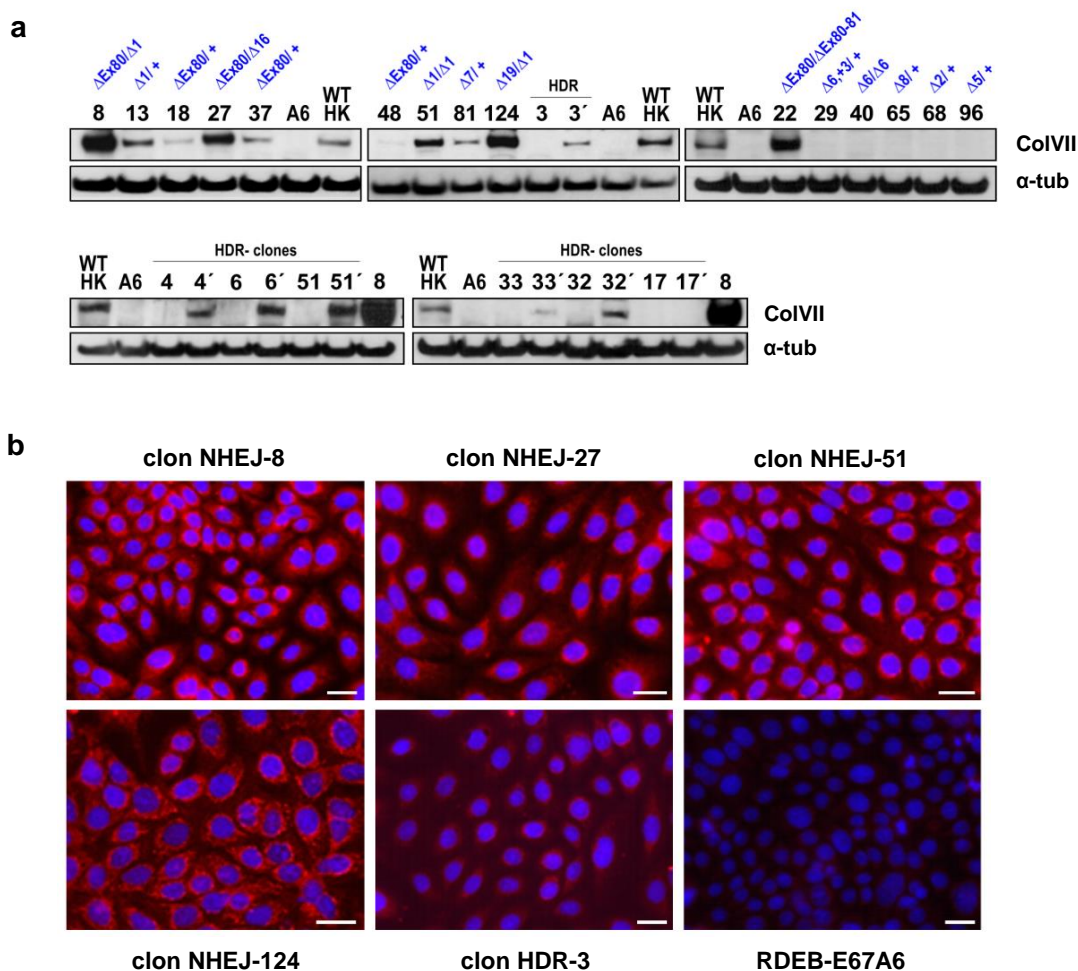


Figura 45. Análisis de la expresión de colágeno VII en clones de queratinocitos RDEB-E67A6 corregidos por RH y NHEJ. **a)** Western blot para la detección de colágeno VII en queratinocitos corregidos por NHEJ (panel superior) y RH (panel inferior). El número de cada clon y su correspondiente genotipo (en azul) se indican encima de cada carril. En el caso de los clones corregidos por RH, se analizó expresión de proteína antes (n) y después (n') de la escisión del casete de selección. El clon NHEJ-8 se incluyó en los geles del panel inferior para hacer patente la diferencia de expresión de colágeno VII en la corrección por RH versus NHEJ. **b)** Inmunofluorescencia para la detección de colágeno VII en queratinocitos de cuatro clones corregidos por NHEJ (NHEJ-8, 27, 51 y 124) y un clon corregido por RH (clon HDR-3). Células de la línea RDEB-E67A6 no editadas se incluyeron en el análisis como control negativo. En azul se muestran los núcleos celulares mediante tinción con DAPI. Barra de escala = 25 μ m.

2.6. Análisis *in vivo* de la incorporación de colágeno VII a la unión dermo-epidérmica

Como se ha mostrado en apartados anteriores, las distintas estrategias de edición génica llevadas a cabo en el gen *COL7A1* han conducido, con éxito, a la recuperación de la expresión de colágeno VII en queratinocitos de la línea RDEB-E67A6. Si bien la estrategia de edición por recombinación homóloga ha permitido corregir específicamente la mutación patogénica c.6527insC, la edición mediante el mecanismo de NHEJ ha permitido demostrar que la modificación o eliminación de la secuencia del exón que contiene la mutación (exón 80) conlleva la recuperación, con alta frecuencia, del marco de lectura alterado y la expresión de proteína. Para determinar si el colágeno VII sintetizado por parte de los queratinocitos corregidos tanto por recombinación homóloga como por NHEJ resultaba finalmente en la deposición de proteína en la unión dermo-epidérmica se realizaron, como se mostrará en este apartado, estudios de expresión *in vivo* mediante el trasplante a ratones inmunodeficientes de equivalentes cutáneos generados a partir de clones corregidos *ex vivo* y posterior estudio de las pieles regeneradas. Este análisis fue especialmente importante en el caso de los clones editados por NHEJ debido a la síntesis de proteínas de colágeno VII con modificación y/o eliminación de aminoácidos a nivel del exón 80.

Para este estudio se seleccionaron los clones NHEJ-8 (heterocigoto compuesto $\Delta\text{Ex80}/\Delta 1$) y NHEJ-37 ($\Delta\text{Ex80}/+$) por su diferente nivel de expresión observado previamente en el análisis por Western blot y, como clon representativo de la corrección por RH, se eligió el clon HDR-3 una vez tratado con la recombinasa Cre.

Para facilitar el seguimiento del injerto en el animal receptor, los queratinocitos fueron marcados con GFP mediante transducción con un vector retroviral antes de pasar a formar parte de equivalentes cutáneos bioingenierizados. Los queratinocitos corregidos *ex vivo* y positivos para GFP se sembraron sobre una matriz de fibrina conteniendo fibroblastos de paciente EBDR nulos para colágeno VII. Los equivalentes dérmicos generados según el procedimiento descrito en el apartado 21 de Materiales y Métodos se trasplantaron en ratones inmunodeficientes y, al cabo de 8 semanas, se recolectaron las pieles regeneradas y positivas para GFP para su posterior análisis.

El análisis para la detección de colágeno VII humano en secciones obtenidas por cortes en congelación de las pieles regeneradas se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo monoclonal LH7.2 (Leigh *et al.*, 1988). Como se observa en la Figura 46, la piel regenerada a partir del clon NHEJ-8 exhibió una fuerte señal en la unión dermo-epidérmica. Este resultado corroboró la sobreexpresión encontrada para dicho clon tanto en el análisis de Western blot (Figura 45a) como de inmunofluorescencia de células en cultivo *in vitro* (Figura 45b). Sin embargo, en los injertos derivados a partir de los clones NHEJ-37 y HDR-3/Cre la señal fue comparable a los niveles fisiológicos de expresión de colágeno VII por comparación con las pieles control regeneradas a partir de queratinocitos humanos normales y considerando que estos dos últimos clones sólo tienen un alelo corregido. Relevantemente, estos resultados también estaban en consonancia con los observados previamente por Western blot (Figura 45a).

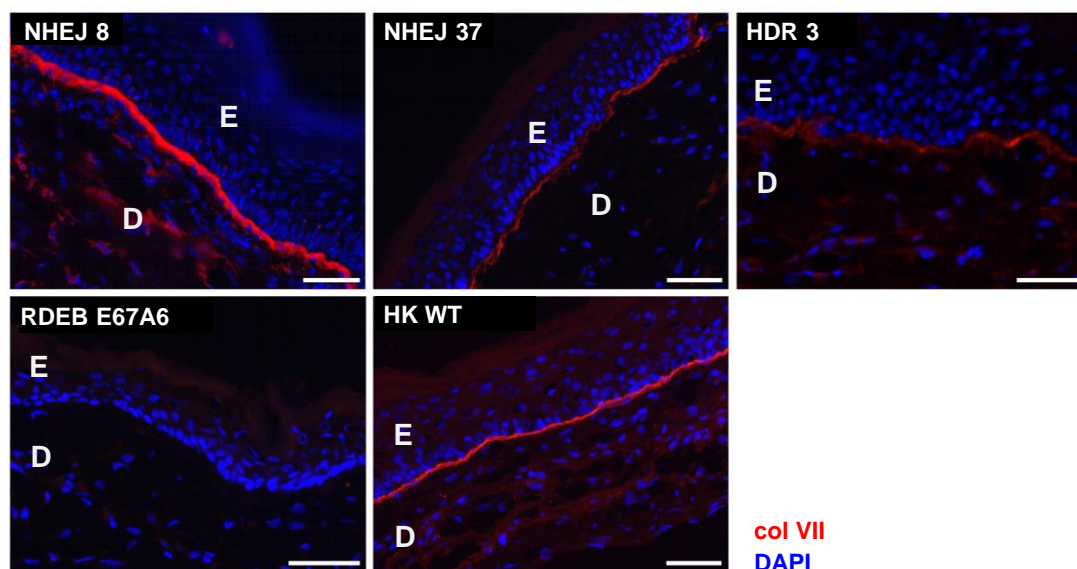


Figura 46. Análisis *in vivo*, mediante inmunofluorescencia, de la incorporación de colágeno VII en la unión dermo-epidérmica en pieles regeneradas tras el trasplante ortotópico a ratones inmunodeficientes de equivalentes cutáneos generados a partir de clones corregidos *ex vivo* mediante NHEJ (clon NHEJ-8 y NHEJ-37) y RH (clon HDR-3). Las pieles regeneradas a partir de queratinocitos RDEB-E67A6 no editados y queratinocitos humanos normales se muestran como control negativo y positivo, respectivamente. En los tres clones analizados se apreció expresión e incorporación de colágeno VII en la zona de unión entre dermis (D) y epidermis (E). El clon NHEJ-8 mostró una notable sobreexpresión de proteína y los clones NHEJ-37 y HDR-3 un nivel de expresión comparable al fisiológico. Los núcleos celulares aparecen marcados en azul (DAPI). Barra de escala= 50 μ m.

Como hemos demostrado, se ha logrado corregir con éxito queratinocitos RDEB-E67A6 mediante dos estrategias de edición génica diferentes. Ambas han permitido que queratinocitos inmortalizados nulos para la expresión de colágeno VII recuperen la expresión de proteína y, además, ésta se deposite en la unión dermo-epidérmica.

Si bien la línea celular inmortalizada RDEB-E67A6 nos ha permitido probar distintas herramientas moleculares y ensayar diferentes protocolos de edición génica, el fin último es la corrección de queratinocitos primarios de paciente. Aunque la corrección de la mutación c.6527insC por recombinación homóloga es muy eficaz en el caso de queratinocitos EBDR inmortalizados, se requiere el aislamiento y genotipado de clones resistentes al antibiótico de selección. Esta tarea supone un mayor grado de dificultad cuando se trata de células madre epidérmicas derivadas de paciente, cuya capacidad clonogénica es limitada. Como se acaba de describir en este trabajo, la reparación por el mecanismo de NHEJ de cortes de doble hebra generadas en el ADN por las nucleasas TALENs ocasiona, generalmente, pequeñas deleciones que tienen el potencial de cambiar el marco de lectura y restaurar, así, la expresión de colágeno VII. Debido a que la estrategia de edición génica por NHEJ no requiere el empleo de antibiótico de selección y permite la obtención, con elevada frecuencia, de clones con re-expresión de colágeno VII, se decidió abordar la corrección de holoclones (clones derivados de células madre epidérmicas) mediante esta aproximación.

3. CORRECCIÓN MEDIANTE EDICIÓN GÉNICA EN QUERATINOCITOS PRIMARIOS DE PACIENTE EBDR

El desarrollo de vectores adenovirales para la expresión de la pareja de nucleasas TALEN T6 y T7 ha permitido corregir, con alta frecuencia, los efectos de la mutación c.6527insC en queratinocitos EBDR inmortalizados.

Debido a que un alto porcentaje de los clones aislados (20%) presentaron *indels* que resultaron en la expresión del alelo editado así como en la síntesis de colágeno VII, se consideró factible abordar, como se mostrará a continuación, la corrección de queratinocitos primarios de paciente mediante la estrategia de NHEJ haciendo uso, igualmente, de los vectores Ad-T6 y Ad-T7.

3.1. Transducción de queratinocitos primarios EBDR con los vectores adenovirales Ad-T6 / Ad-T7

El experimento de edición génica por NHEJ se llevó a cabo en queratinocitos primarios (pase 1) procedentes del mismo paciente EBDR del que se obtuvieron queratinocitos para su posterior inmortalización y derivación de la línea RDEB-E67A6. Esta línea, como se ha mostrado hasta esta parte del trabajo, ha sido empleada como modelo celular para el ensayo de estrategias de terapia génica clonal.

El primer paso antes de proceder a los experimentos de edición génica, fue la comprobación de la capacidad de los Ad-TALEN para transducir queratinocitos primarios humanos. Para ello, los queratinocitos se infectaron con los vectores adenovirales Ad-T6 y Ad-T7 a la misma MOI que la utilizada en los experimentos de edición génica llevados a cabo en la línea RDEB-E67A6. Aunque las células se transdujeron eficientemente observándose una expresión de GFP intensa y generalizada, la MOI de 1000 PV/célula resultó tóxica. Fue fundamental, por tanto, determinar la MOI necesaria para conseguir la transducción de las células con la máxima eficiencia y la mínima toxicidad. Para ello, se probaron MOIs más bajas: 500 y 300 PV/célula. Al cabo de tres días de la transducción, las células de la MOI más baja habían llegado a confluencia y, tras realizar un pase, se comprobó que continuaban creciendo vigorosamente. La MOI de 300 PV/célula no parecía resultar tóxica, sin embargo, había que comprobar la actividad de las TALENs a la MOI indicada. Para ello se llevó a cabo el ensayo de CEL-1.

3.1.1. Evaluación de la actividad nucleasa mediante el ensayo de CEL-1

La actividad de la pareja de TALENs T6/T7 a la MOI que resultó menos tóxica para los queratinocitos primarios de paciente se evaluó, en paralelo, junto con la MOI de 500 y 1000 PV/célula. Hay que recordar la MOI 1000 fue la empleada en los experimentos previos de NHEJ sobre la línea RDEB-E67A6. Como se aprecia en la Figura 47, la reducción de la MOI a 300 PV/célula no condujo a una reducción importante de la actividad nucleasa, por lo que esta MOI fue elegida para llevar a cabo el experimento de NHEJ en queratinocitos primarios.

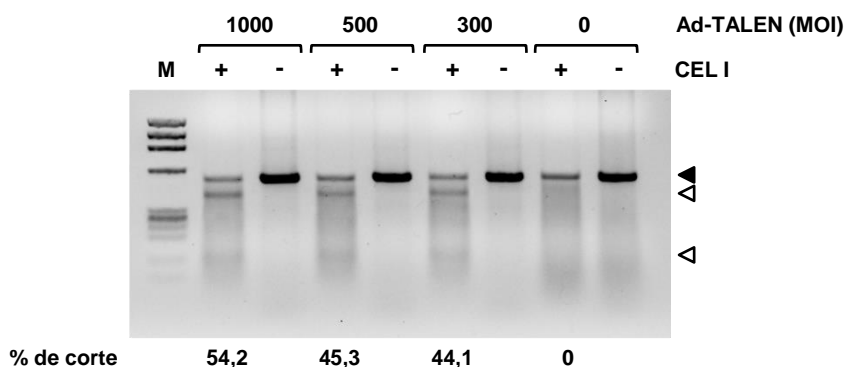


Figura 47. Evaluación de la actividad nucleasa de las TALENs T6 y T7 mediante el ensayo de CEL-1. Queratinocitos primarios de paciente se co-transdujeron con los vectores adenovirales en una proporción 1:1 (Ad-TALEN F/Ad-TALEN R) a una MOI total de 1000, 500 y 300 PV/célula. El producto de amplificación de ~ 500 pb se sometió a la formación de heterodúplex y se digirió con CEL-1. La cabeza de flecha negra indica producto de PCR no digerido y las cabezas de flecha blancas los productos de menor peso molecular resultado de la actividad de CEL-1 en las zonas de desapareamiento debido a la presencia de *indels*. El porcentaje de corte para cada producto de PCR se muestra en la parte inferior del gel. M: marcador de peso molecular IX.

3.1.2. Estimación del porcentaje de células con re-expresión de colágeno VII en la población policlonal de queratinocitos EBDT transducida con los vectores adenovirales Ad-T6 / Ad-T7

Una vez establecida la MOI que permitía una adecuada actividad nucleasa con la mínima toxicidad, se procedió directamente a la detección de colágeno VII mediante inmunofluorescencia en una población de queratinocitos primarios de paciente transducidos con los vectores adenovirales Ad-T6/Ad-T7. Como se observa en la Figura 48, la tinción con el anticuerpo monoclonal LH7.2. reveló claramente la presencia de células positivas (indicadas por flechas blancas).

El análisis de varios campos permitió estimar el porcentaje de células con re-expresión de colágeno VII, aproximadamente, en un 10 %.

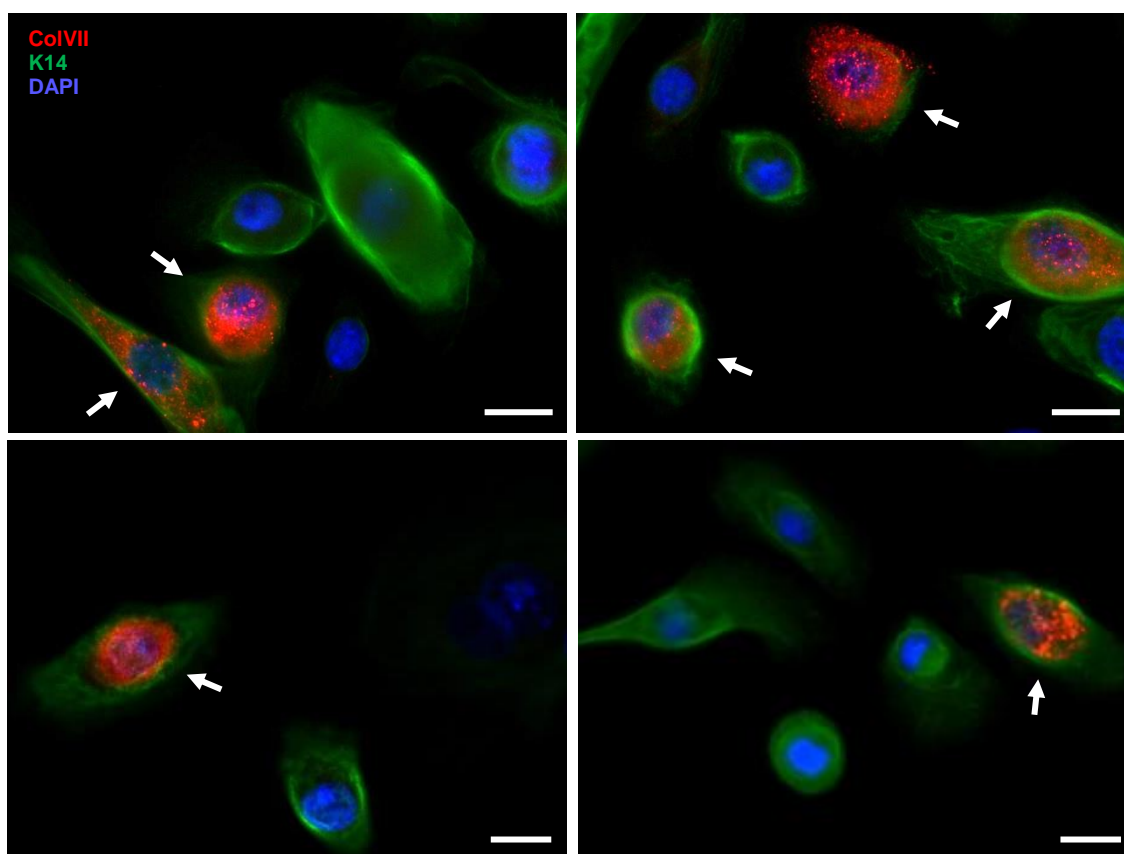


Figura 48. Detección de colágeno VII en queratinocitos primarios EBDR transducidos con los vectores adenovirales Ad-T6 y Ad-T7. Aproximadamente el 10 % de los queratinocitos fue positivo para colágeno VII. Células positivas indicadas con flechas blancas. Barra de escala= 25 μ m.

Tras el resultado de este análisis, consideramos factible proceder al desarrollo de una estrategia que permitiera el aislamiento de poblaciones clonales genéticamente corregidas para su posterior estudio *in vivo* mediante la generación de equivalentes cutáneos y el trasplante a ratones inmunodeficientes.

3.2. Aislamiento de clones a partir de la población policlonal transducida con los vectores Ad-T6 / Ad-T7 y genotipado por secuenciación

Queratinocitos primarios EBDR (pase 1) se cultivaron sobre células letalmente irradiadas 3T3-J2 según procedimiento descrito en el apartado 2 de Materiales y Métodos. Debido a que se ha descrito previamente que los queratinocitos EBDR presentan dificultades de crecimiento en cultivo *in vitro* (Morley *et al.*, 2003), decidimos en primer lugar subcultivar las células a baja densidad en presencia de *feeder* para determinar la capacidad de generación de colonias. Este parámetro se considera el indicador más fiable de la capacidad de crecimiento de un cultivo de queratinocitos. Las células EBDR de las que disponíamos mostraron en estos ensayos un vigor suficiente como para llevar a

cabo un procedimiento de corrección clonal basado en la estrategia de edición génica por NHEJ. El desarrollo de estrategias clonales es fundamental para evitar la heterogeneidad de la población celular transducida.

Así pues, los queratinocitos primarios se transdujeron con los vectores portadores de las nucleasas TALENs a una MOI de 300 PV/célula y se siguió el procedimiento descrito en el apartado 16.2. de Materiales y Métodos. Un total de 21 clones con gran capacidad proliferativa se extrajeron mediante el sistema de clonaje por anillos y se genotiparon por secuenciación. La lectura de los cromatogramas reveló la existencia de dos clones con *indels*. Ambos clones presentaron, justamente, la modificación que ya habíamos observado que se producía con mayor frecuencia: la delección de un único par de bases (recordar experimento de NHEJ en queratinocitos RDEB-E67A6, apartado 2.4.1 de Resultados). Un clon (#40) presentó la delección c.6512delG en homocigosis y el otro clon (#11) en heterocigosis (Figura 49).

La proporción de células positivas para colágeno VII observada en el análisis de inmunofluorescencia de la población policlonal transducida (~10%) estaba en consonancia con el porcentaje de clones aislados con *indels* compatibles con la re-expresión de proteína (2 de 21 clones).

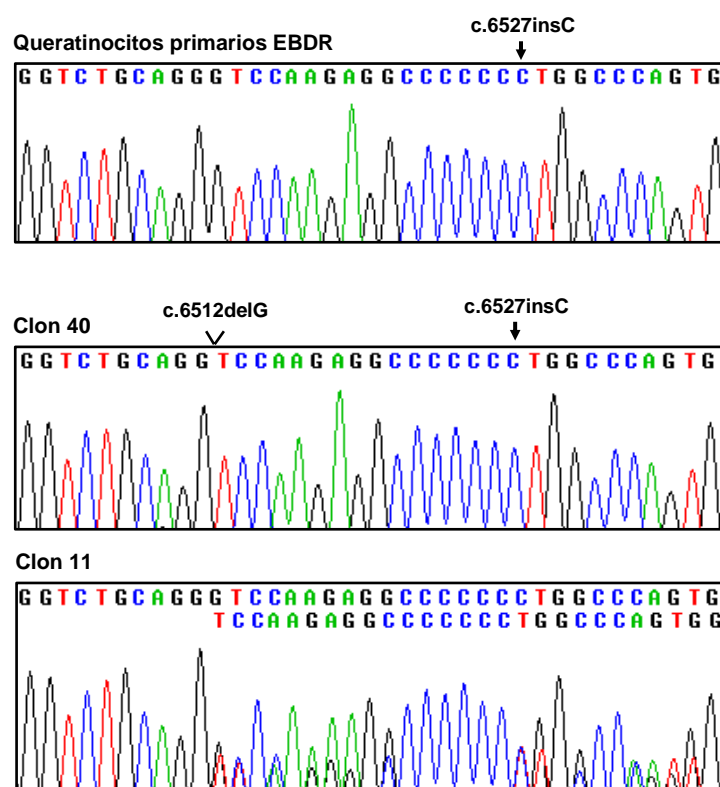


Figura 49. Cromatogramas que muestran la secuencia correspondiente al exón 80 de los dos clones de queratinocitos primarios EBDR editados por NHEJ. El clon #40 presentó la delección c.6512delG en homocigosis y el clon #11 en heterocigosis. Queratinocitos primarios EBDR no transducidos (cromatograma superior) presentaron, como era previsible, la mutación c.6527insC en homocigosis como única alteración en el exón 80.

Aunque pudimos comprobar en clones de la línea que la delección c.6512delG permitía recuperar el marco de lectura alterado por la presencia de la mutación c.6527insC y conducía a la re-expresión de colágeno VII (ver clones 13 y 51 en la Figura 45a de Resultados) decidimos verificar, como se mostrará en el siguiente apartado, la expresión de proteína en los dos clones EBDR editados (clones 40 y 11) obtenidos en este ensayo.

3.2.1. Análisis por Western blot de la expresión de colágeno VII en los clones EBDR editados

La expresión de colágeno VII en los clones 11 y 40 se evaluó mediante Western blot. En el análisis se incluyeron también, como controles positivos, los clones 13 y 51 de la línea RDEB-E67A6 ya que ambos presentaban el mismo *indel* que los clones 11 y 40, la delección c.6512delG en heterocigosis y homocigosis, respectivamente, y ya habían sido verificados por Western blot junto con el resto de clones RDEB-E67A6 editados (Figura 45a, apartado de Resultados).

Como se aprecia en la Figura 50, los clones EBDR editados 11 y 40 presentaron expresión de proteína a niveles comparables a sus correspondientes clones obtenidos en el experimento de NHEJ sobre la línea. Como era esperable, los clones con los dos alelos editados presentaron mayor expresión que los heterocigotos. De modo relevante, en los clones 11 y 40 también se observó cierto grado de sobreexpresión al igual que en los clones 13 y 51. Esta observación será discutida posteriormente.

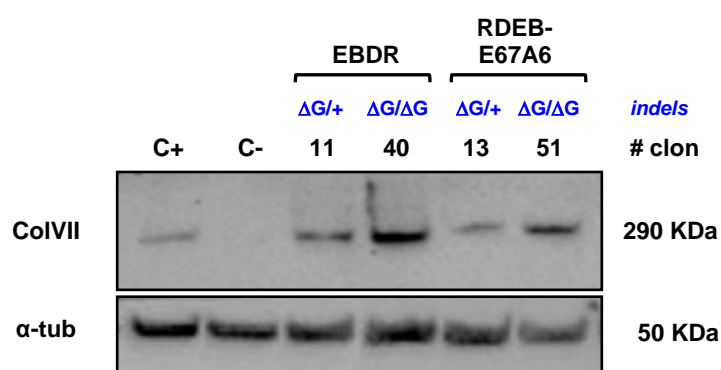


Figura 50. Western blot para la detección de colágeno VII en clones de queratinocitos primarios EBDR (11 y 40) y de la línea RDEB-E67A6 (13 y 51) editados por NHEJ. El número de cada clon y su correspondiente genotipo (en azul) se indican encima de cada carril. Como control de carga se analizó la expresión de α -tubulina. C+: queratinocitos primarios normales. C-: queratinocitos primarios EBDR.

Una vez comprobado que la delección c.6512delG conducía a la re-expresión de colágeno VII en queratinocitos primarios EBDR, se procedió a la generación de equivalentes dermo-epidérmicos para su posterior trasplante ortotópico en ratones inmunodeficientes.

3.2.2. Restablecimiento de la expresión de colágeno VII y regeneración de epidermis a partir de la progenie de células madre epidérmicas EBDR editadas

Se ha demostrado que la alta tasa de renovación celular de la piel impide que queratinocitos inyectados o injertados puedan persistir a largo plazo en el tejido dermo-epidérmico (Baldeschi *et al.*, 2003; Sebastiano *et al.*, 2014). Por este motivo, la corrección de células madre epidérmicas ofrece la

mejor opción para llevar a cabo protocolos de terapia génica en EBDR. Debido a que los holoclones (clones de células madre de queratinocitos humanos) presentan una gran capacidad de regeneración de piel probada a largo plazo (Duarte *et al.*, 2014; Larcher *et al.*, 2007), la edición de células madre permitiría la generación de equivalentes de piel trasplantables con potencial terapéutico para los pacientes EBDR facilitando así la traslación de los protocolos de edición génica a la práctica clínica.

Para demostrar la factibilidad de nuestra estrategia teniendo en cuenta los motivos anteriormente expuestos, consideramos esencial, en primer lugar, determinar el tipo clonal de los dos clones editados y previamente verificados para la expresión de colágeno VII. Para determinar si los clones 11 y 40 derivaban de células madre epidérmicas genéticamente corregidas por NHEJ se procedió a la evaluación de la capacidad de regeneración de piel humana a largo plazo. Para ello, las células editadas se sembraron sobre una matriz tridimensional de fibrina conteniendo fibroblastos EBDR no transducidos (ver protocolo apartado 21 de Materiales y Métodos) y tras alcanzar la confluencia los equivalentes dermo-epidérmicos se trasplantaron ortotópicamente en ratones inmunodeficientes.

Como se muestra en la Figura 51, ambos clones fueron capaces de generar una epidermis normal que permaneció aparentemente adherida a la dermis subyacente durante las **12 semanas de** observación post-trasplante. La presencia de piel humana en la zona del trasplante durante 3 meses fue indicativa de que tanto el clon 11 como el clon 40 se obtuvieron, cada uno, a partir de una única célula madre epidérmica y podían, por tanto, considerarse **holoclones**.

Aunque se considera trasplante de larga duración a partir de 8 semanas, mantuvimos los injertos un mes más para estar completamente seguros del tipo clonal. En tres meses se producen tres ciclos de renovación epidérmica completos. La presencia de piel humana al cabo de 12 semanas sólo es posible si el tipo clonal trasplantado es un holoclón.



Figura 51. Regeneración de piel humana tras el trasplante ortotópico a ratones inmunodeficientes de equivalentes bioingenierizados conteniendo queratinocitos del clon 11 (izquierda) o del clon 40 (derecha). Las imágenes muestran la apariencia macroscópica de la piel regenerada a las 12 semanas post-trasplante. La visualización bajo luz blanca permite distinguir la zona con piel humana (línea discontinua negra) de la zona con reepitelización del tejido circundante (piel del ratón).

A continuación, se procedió al análisis de la resistencia mecánica de las pieles humanas reconstituídas. Tras aplicar un ligero estrés mecánico la epidermis pudo separarse fácilmente de la

dermis tanto en los injertos del clon 11 como del clon 40 (Figura 52a). Ante esta observación, decidimos extraer ADN de la epidermis levantada para comprobar el genotipo de los queratinocitos que la constituían. La lectura de los cromatogramas verificó la presencia, exclusivamente, de células de los correspondientes clones (Figura 52b) descartándose, por tanto, la contaminación por clones EBDR no editados. No obstante, una parte del área del injerto fue procesada histológicamente y se analizó la expresión de colágeno VII mediante inmunofluorescencia (Figura 52c).

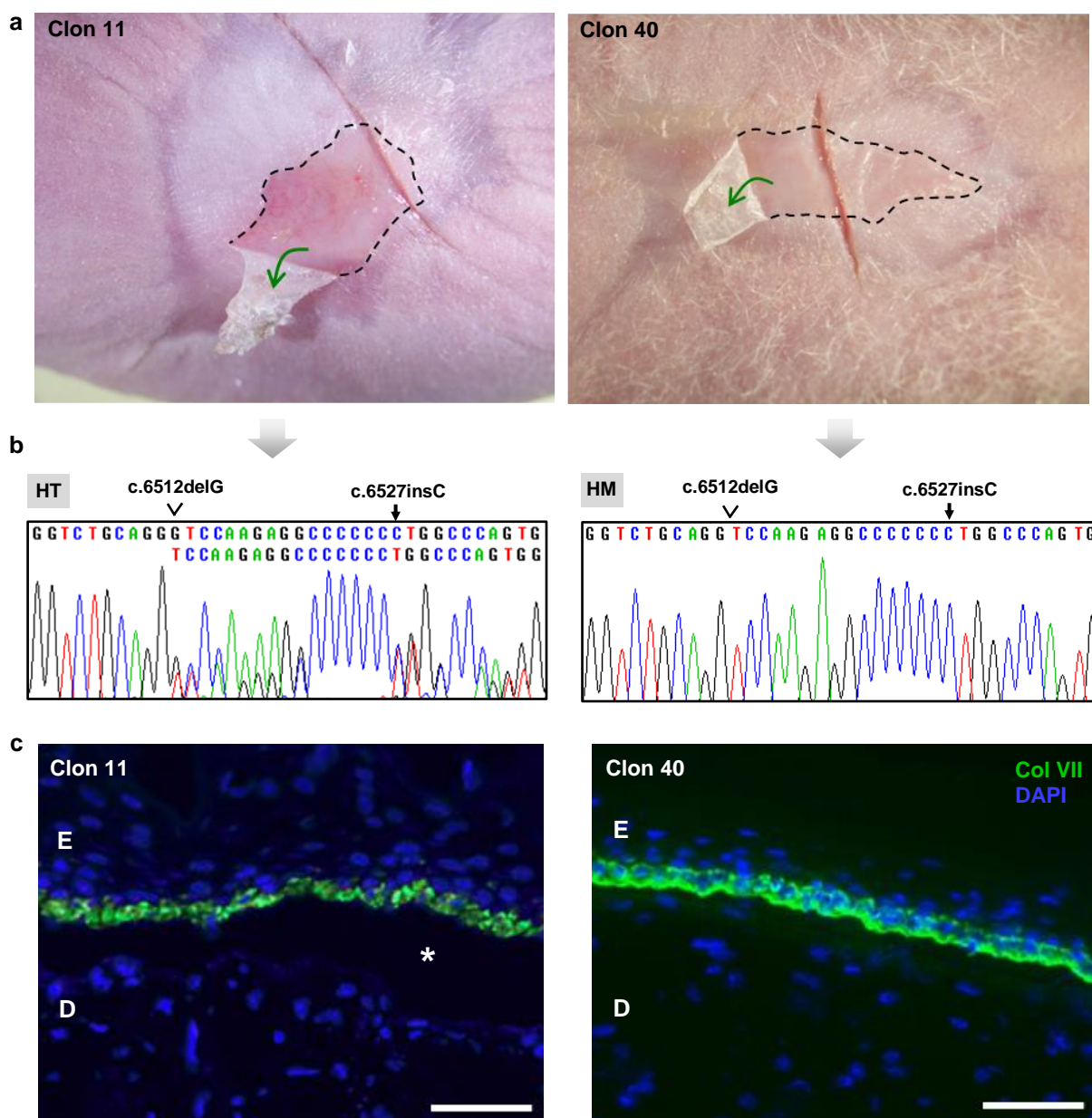


Figura 52. Análisis del tejido cutáneo regenerado a partir de los clones editados *ex vivo*. a) Estudio de las propiedades biomecánicas de la piel reconstituida. Al aplicar un ligero estrés mecánico, la epidermis se separó de la dermis subyacente ofreciendo una mínima resistencia. b) Genotipado por secuenciación de los queratinocitos de la epidermis extraída del área del injerto. Los cromatogramas muestran como único *indel* la delección c.6512delG en heterocigosis (HT) (injerto clon 11) u homocigosis (HM) (injerto clon 40) lo que demuestra que las pieles se regeneraron, exclusivamente, a partir de clones puros. c) Análisis por inmunofluorescencia de la expresión de colágeno VII en las pieles regeneradas. Nótese la presencia de colágeno VII en el citoplasma de las células basales. El asterisco en la imagen izquierda indica una zona de separación dermo-epidérmica. Barra de escala= 50 μ m.

Aunque la expresión de colágeno VII fue evidente en las pieles regeneradas a partir de ambos clones, la presencia en grandes cantidades de proteína en el citoplasma de las células basales podría estar indicando un problema de secreción del colágeno editado. Esta observación podría estar relacionada con la sobreexpresión apreciada en el análisis previo por Western blot (ver Figura 50). La retención de proteína en las células es compatible con el *indel* generado y podría explicar la débil adhesión de la epidermis regenerada.

Relevantemente, este experimento nos ha permitido demostrar que el proceso de transducción y edición génica mediante la expresión transitoria de nucleasas TALENs es compatible con el mantenimiento de la capacidad “stem” de las células madre epidérmicas.

V. DISCUSIÓN

La EBDR es la forma de epidermolisis más frecuente y con efectos más devastadores para los pacientes. La gravedad de esta enfermedad ha impulsado el desarrollo de estrategias terapéuticas innovadoras (Itoh *et al.*, 2011; Remington *et al.*, 2009; Siprashvili *et al.*, 2010; Tolar *et al.*, 2011; Wong *et al.*, 2008; Woodley *et al.*, 2007) incluyendo procedimientos de alto riesgo como el trasplante de médula ósea alogénico (Tolar y Wagner, 2013, 2012; Wagner *et al.*, 2010). Desafortunadamente, a pesar de todos los esfuerzos, los únicos tratamientos disponibles actualmente siguen siendo meramente paliativos (Uitto *et al.*, 2016).

Para avanzar hacia terapias más seguras y eficaces, varios laboratorios han abordado la corrección de EBDR mediante terapia génica. Sin embargo la naturaleza repetitiva y el gran tamaño del ADNc del COL7A1, unidos al potencial riesgo de genotoxicidad por mutagénesis insercional (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2008; Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003), constituyen importantes obstáculos para el desarrollo de protocolos de terapia génica por reemplazamiento basados en vectores retrovirales. La corrección de las mutaciones mediante los nuevos procedimientos de edición génica emerge como una alternativa más precisa. El concepto de terapia génica clonal como estándar superior de bioseguridad fue inicialmente propuesto con la demostración de que es factible generar piel humana a partir de una única célula madre epidérmica portando una única inserción retroviral extensamente caracterizada (Larcher *et al.*, 2007) y desarrollado recientemente en un experimento de terapia génica por reemplazamiento con la corrección de EBDR en clones de células madre epidérmicas transducidas con un vector retroviral para la expresión de ColVII (Droz-Georget Lathion *et al.*, 2015). Sin embargo, la corrección precisa de una mutación patogénica en clones de células madre epidérmicas mediante técnicas de edición génica era un logro aún por alcanzar. En esta tesis abordamos por primera vez este objetivo, consiguiendo la corrección clonal de una genodermatosis monogénica, EBDR, en células epidérmicas de pacientes mediante tecnología de edición génica (Chamorro *et al.*, 2016). Algunos laboratorios han abordado la corrección por edición génica de mutaciones causantes de EBDR en células iPS derivadas de pacientes y la posterior derivación de queratinocitos a partir de estas células (Osborn *et al.*, 2013; Sebastiano *et al.*, 2014). Sin embargo, pese a que se han logrado obtener queratinocitos humanos por diferenciación controlada de células iPS (Itoh *et al.*, 2011) los protocolos para generar células madre epidérmicas *in vitro* a partir de células iPS que sean útiles para regenerar piel con potencial de persistencia a largo plazo no están aún establecidos. Además no está demostrado que los queratinocitos generados por diferenciación de estas células sean seguros ya que podrían generar tumores al ser trasplantados. Por tanto, para poder plantear ensayos más próximos a una aplicación clínica de corrección de mutaciones causantes de EBDR por edición génica, es necesario llevar a cabo la corrección en clones de queratinocitos humanos, para los que está ampliamente demostrada su capacidad de regenerar piel a largo plazo en contextos de utilidad clínica. Trabajos previos del laboratorio habían demostrado la factibilidad de la estrategia en un clon de células madre epidérmicas en los que el gen de la proteína verde fluorescente había sido insertado en el locus AAVS1 mediante recombinación homóloga facilitada por nucleasas tipo ZFN (Duarte *et al.*, 2014). En este trabajo de tesis describimos el desarrollo y utilización de las herramientas moleculares para llevar a cabo la corrección de una mutación (c.6527insC) causante de EBDR en un gran porcentaje de pacientes de

la población española, y demostramos que es factible obtener clones de queratinocitos de paciente corregidos mediante el uso de estas herramientas. Dada la notable dificultad de aislar y expandir clones de células madre epidérmicas, especialmente cuando provienen de valiosas muestras de pacientes, difíciles de obtener y a menudo con un compartimento *stem* limitado por agotamiento proliferativo al provenir de pacientes adultos en estado de cicatrización continuada, desarrollamos en primer lugar un modelo celular de la enfermedad consistente en una línea celular inmortalizada de queratinocitos de paciente. Esta línea celular, RDEB-E67A6, es notablemente más sencilla de cultivar que los queratinocitos humanos primarios y es altamente clonogénica, lo que nos ha permitido obtener y genotipar un elevado número de clones de queratinocitos de paciente transducidos con nuestros vectores de edición génica, facilitando así el ensayo de efectividad de nuestras herramientas. Para llevar a cabo la corrección de la mutación recurrente c.6527insC, consistente en la inserción de una citosina en el exón 80 de *COL7A1* que resulta en la pérdida del marco de lectura, hemos desarrollado nucleasas TALEN capaces de generar cortes en doble cadena del ADN en las proximidades de esta mutación, y hemos explorado dos vías posibles de corrección utilizando estas nucleasas: sustitución de la secuencia mutada mediante recombinación homóloga y generación de deleciones en las proximidades de la mutación que ocasionan la recuperación del marco de lectura.

Para la primera aproximación utilizamos, en conjunción con los vectores adenovirales para la expresión de las nucleasas TALEN, vectores virales adenoasociados para introducir nuestras construcciones de recombinación homóloga en los queratinocitos, ya que la utilización de este tipo de vectores con ADN de cadena simple favorece la recombinación homóloga. Las construcciones utilizadas se basaban en selección por expresión de la proteína neo para conferir resistencia a la geneticina. La utilización de vectores no integrativos, adenovirales y adenoasociados, nos permite llevar a cabo modificaciones precisas de modo eficaz en células difíciles de transfectar evitando los riesgos asociados al uso de vectores integrativos (Maggio y Goncalves, 2015). En nuestros experimentos obtuvimos frecuencias de recombinación de entre el 11 y el 39% de los clones resistentes a geneticina analizados. La frecuencia más alta de recombinación se consiguió utilizando diseños basados en trampa de *splicing* en los que la expresión de neo no es dirigida por un promotor constitutivo sino dependiente de la integración de la construcción en una secuencia intrónica en fase con neo. Si bien se han descrito correcciones por recombinación homóloga mediadas por vectores AAV en ausencia de cortes en dobles cadena en queratinocitos humanos (Sebastiano *et al.*, 2014), la utilización de nucleasas es habitualmente necesaria para obtener frecuencias de recombinación significativas. Consecuentemente, cuando llevamos a cabo la transducción de queratinocitos exclusivamente con los vectores AAV que introducen las construcciones de recombinación homóloga en ausencia de co-infección con los vectores adenovirales para expresión de nucleasas TALENs no obtuvimos ningún clon recombinante. La mayor parte de los clones corregidos mediante recombinación homóloga (32 de 34) portaban la secuencia silvestre del exon 80 de *COL7A1*, mostrando la eficiencia correctora de nuestros diseños de recombinación homóloga. Una vez eliminado el casete de selección, flanqueado por secuencias lox, mediante la expresión de recombinasa Cre, pudimos comprobar que todos los clones de queratinocitos de paciente corregidos

expresaban proteína ColVII a niveles comparables a queratinocitos normales, al restaurarse la secuencia original del gen.

Los datos obtenidos en nuestro modelo celular de queratinocitos de paciente inmortalizados demuestran que es posible obtener altas frecuencias de corrección de la mutación c.6527insC mediante recombinación homóloga mediada por vectores virales no integrativos para introducir nucleasas genómicas y construcciones de recombinación homóloga y usando una estrategia de selección con geneticina, abriendo el paso a futuros experimentos de corrección en queratinocitos primarios de paciente siguiendo este protocolo.

Sin embargo, para disponer de protocolos de edición correctiva de la mutación c.6527insC que pudieran llevarse a cabo eficientemente en células madre epidérmicas de pacientes era deseable desarrollar un procedimiento de edición más sencillo y libre de selección con drogas. En este trabajo demostramos que es posible conseguir producir variantes de ColVII en queratinocitos de paciente mediante la generación de deleciones en las proximidades de la mutación c.6527insC en el exon 80 de *COL7A1* cuando los cortes en doble cadena del ADN son reparados por el mecanismo de NHEJ. Tras la transducción de los queratinocitos de la línea RDEB-E67A6 con los vectores adenovirales portadores de las TALENs T6 y T7, se encontró que un alto porcentaje de los clones aislados (20%) resultaron tener *indels* compatibles con la restauración del marco de lectura en, al menos, un alelo. Además, todos los clones analizados con *indels* compatibles con la recuperación de la pauta de lectura mostraron expresión del alelo editado así como síntesis de colágeno VII.

De los 19 tipos de *indels* diferentes que se identificaron en los 113 clones genotipados en total, la deleción de un único par de bases (c.6512delG) fue la modificación más frecuente, encontrándose en el 37% de los clones con *indels* (11 de 30 clones). La limitada diversidad de alelos con modificaciones generadas por el mecanismo de NHEJ ha sido descrita previamente (Gagnon *et al.*, 2014). Esta deleción ocasiona la recuperación del marco de lectura de *COL7A1* pero da lugar al cambio de cuatro aminoácidos codificados por los codones inmediatamente precedentes a la mutación c.6527insC. De manera relevante, el 30% de los clones editados (9 de 30) presentaron *indels* que resultaron en la síntesis de transcritos carentes del exón donde se localiza la mutación c.6527insC (exón 80), lo que se denomina *exon skipping* o salto del exón. Varios clones editados monoalélicamente portadores de deleciones de diferente tamaño ($\Delta 18$, $\Delta 34$, $\Delta 40$ y $\Delta 42$) y que implicaban la síntesis de transcritos de *COL7A1* sin exón 80, fueron analizados por Western blot (clones 22, 37, 48 y 18, Figura 45a apartado 2.5 de Resultados) detectándose en todos ellos expresión de colágeno VII. Las proteínas ColVII conteniendo mutaciones o deleciones pueden mantener total o parcialmente su funcionalidad cuando se preserva la estructura del dominio colagenoso, constituido por repeticiones Gly-X-Y (Bornert *et al.*, 2016). Esta región de ColVII es la implicada en su ensamblaje en la conformación en triple hélice de las cadenas de colágeno previa a su secreción y formación de fibrillas de anclaje (Varki *et al.*, 2007). Así, mientras que mutaciones que ocasionan cambios de la glicina situada en la primera posición de estas repeticiones por otro aminoácido son a menudo causantes del fenotipo dominante en pacientes EBD, deleciones que abarcan una o varias repeticiones Gly-X-Y dan lugar a proteínas ColVII funcionales (Dang y Murrell, 2008; McGrath *et al.*, 1999; Toyonaga *et al.*, 2015). Por otra parte, los

exones del gen *COL7A1* que codifican el dominio colagenoso (exones 29-112) son de pequeño tamaño y se encuentran dispuestos de modo que el primer nucleótido de cada exón corresponde al primer nucleótido de un codón codificante para Gly. Estas características del gen *COL7A1* han permitido el abordaje de estrategias terapéuticas basadas en salto de exones mediado por transfección de oligoribonucleótidos antisentido (Bornert *et al.*, 2016; Bremer *et al.*, 2016; Goto *et al.*, 2006). Recientemente se mostró que la eliminación del exon 80 mediante esta técnica en queratinocitos y fibroblastos de pacientes EBDR con una mutación en este exon llevó a la re-expresión de ColVII capaz de formar fibrillas de anclaje (Turczynski *et al.*, 2016). La transfección con oligoribonucleótidos se ha estudiado principalmente para lograr corrección por *exon skipping* en mutaciones causantes de distrofia muscular de Duchenne, si bien el uso de esta tecnología en protocolos de corrección *in vivo* se ha visto limitado por la dificultad de la administración *in vivo* de los oligoribonucleótidos al tejido muscular y la limitada duración de la corrección. La corrección estable a largo plazo podrá alcanzarse mediante la edición del genoma de las células de los pacientes. Recientemente se ha demostrado que es factible abordar la corrección de la distrofia muscular de Duchenne en células musculares de pacientes por recuperación del marco de lectura mediante generación de *indels* por nucleasas genómicas que ocasionan la excisión de exones conteniendo mutaciones patogénicas (Ousterout *et al.*, 2015; Ousterout *et al.*, 2013). Nuestros resultados de corrección del marco de lectura por edición de *COL7A1* en queratinocitos de pacientes constituyen la primera demostración de este abordaje en EBDR (Chamorro *et al.*, 2016). La disponibilidad de herramientas (nucleasas TALENs vehiculizadas en vectores adenovirales) capaces de generar *indels* en la región de la mutación c.6527insC con elevada frecuencia nos permitió abordar, en la última etapa de este trabajo de tesis, la corrección por edición en células madre epidérmicas de pacientes. En un primer análisis sobre una población policlonal de queratinocitos de paciente transducidos con nuestros vectores adenovirales pudimos detectar re-expresión de ColVII mediante inmunofluorescencia en aproximadamente un 10% de las células. Procedimos a continuación a aislar, a partir de estas células transducidas, clones que por su capacidad proliferativa y morfología poseían características de células madre epidérmicas. El genotipado de la región diana de las nucleasas mostró que 2 de 21 clones contenían un *indel* compatible con la restauración del marco de lectura. Cuando estos clones fueron utilizados para generar equivalentes dermo-epidérmicos e injertados en ratones inmunodeficientes, ambos dieron lugar a piel humana con persistencia a largo plazo, demostrándose así que ambos son *bona fide* clones de células madre epidérmicas.

En ambos clones la mutación correctiva resultó ser la delección c.6512delG en la región diana de las TALENs T6/T7, presentándose en heterocigosis en el clon 11 y en homocigosis en el clon 40. Esta mutación, que fue también la más frecuentemente detectada en el análisis de clones de queratinocitos RDEB-E67A6 transducidos con T6/T7, lleva a la sustitución de cuatro aminoácidos (Gly-Pro-Arg-Gly-Pro-Pro en la forma silvestre por Val-Gln-Glu-Ala-Pro-Pro en la forma editada) en la región del dominio colagenoso codificada por el exon 80 de *COL7A1*, implicando la alteración de dos repeticiones Gly-X-Y consecutivas y es por tanto altamente susceptible de generar una forma funcionalmente disminuída de ColVII. Consecuentemente, las pieles obtenidas a partir de los clones editados demostraron fragilidad en la adhesión dermo-epidérmica cuando fueron sometidas a estrés

mecánico, a pesar de que se detectó abundante proteína ColVII. La introducción de la delección de 1 pb resultó, tanto en los clones de queratinocitos RDEB-E67A6 como en los dos clones de células madre epidérmicas analizadas, en una notable sobreexpresión de proteína ColVII respecto a los queratinocitos humanos normales, fácilmente observable en los análisis de Western blot. Este incremento podría ser explicado, al menos en parte, por una secreción disminuida de la proteína ColVII mutada, ya que la formación de la estructura en triple hélice del colágeno, previa a la secreción, podría estar dificultada por la alteración de dos repeticiones Gly-X-Y en el dominio colagenoso y causar la retención de ColVII en los queratinocitos editados. Las imágenes de inmunofluorescencia de colágeno VII en las que se observa expresión proteica intracelular en todo el estrato basal de la epidermis de los trasplantes y en menor medida en la lámina basal (ver Figura 52c de Resultados), confirmarían esta presunción.

Si bien la re-expresión de esta proteína ColVII mutada no permitió restablecer la unión dermoepidérmica en nuestro ensayo en pieles regeneradas, estos resultados demuestran la factibilidad de conseguir regeneración de piel humana capaz de persistir en injertos a largo plazo a partir de clones únicos de células madre epidérmicas de pacientes manipuladas mediante edición génica para recuperar la proteína cuya falta está en el origen de la patología. En próximos experimentos perseguiremos el aislamiento y caracterización de clones de células madre epidérmicas portando *indels* que ocasionen el salto del exón 80, y por tanto generen proteínas ColVII truncadas que preserven la estructura del dominio colagenoso y, previsiblemente, restauren la adhesión dermoepidérmica en pieles regeneradas a partir de estos clones. La elevada frecuencia de generación de estos *indels* demostrada en nuestro modelo de queratinocitos inmortalizados permite prever que esta aproximación es factible. La obtención de otras modificaciones correctivas precisas en células madre epidérmicas de paciente, incluyendo la generación de una delección de un nucleótido (citocina) en la posición de la mutación c.6527insC para restaurar la secuencia silvestre también serán abordadas, para lo que utilizaremos nuevos pares de nucleasas TALEN dirigidas a la posición de la mutación.

La estrategia de edición génica basada en corrección de clones de células madre epidérmicas permite caracterizar exhaustivamente las células corregidas como paso previo a su utilización en protocolos preclínicos. Si bien las nucleasas TALEN empleadas en nuestro trabajo están diseñadas para generar cortes en una única localización específica del genoma, la posibilidad de generación de cortes en otras localizaciones genómicas con similitud de secuencia debe ser tomada en cuenta en análisis de bioseguridad. La especificidad relativa de unos tipos de nucleasas frente a otros es un tema controvertido y aún por establecer, pero algunos autores apuntan a la posible mayor especificidad de las nucleasas TALEN, que requieren de la formación de un dímero, y por tanto presentan una extensa región de unión al ADN, respecto a nucleasas monoméricas como CRISPR/Cas9, en las que la unión a la secuencia diana está mediada por una interacción ARN/ADN de una secuencia más corta y que admite varios desapareamientos (Kim y Kim, 2014; Mussolino *et al.*, 2014). En cualquier caso, la especificidad de las nucleasas debe ser establecida en cada caso como medida necesaria de bioseguridad. En este trabajo abordamos el estudio de los cortes fuera de posición (*off-target*) mediante el análisis informático del genoma humano para identificar lugares con similitud de secuencia (Fine *et al.*, 2014a) y el estudio de existencia de *indels* en esas posiciones, sin

que se encontraran alteraciones en ninguno de los lugares genómicos estudiados. Dada la centralidad de la especificidad de la introducción de mutaciones en protocolos de terapia génica, contemplamos el estudio futuro de actividad *off-target* de las nucleasas seleccionadas mediante métodos no sesgados de análisis genómico que puede ser llevado a cabo para cada clon de queratinocitos corregidos previo a su uso para la generación de piel trasplantable, junto con análisis de cariotipo y otras caracterizaciones de bioseguridad.

En conjunto, nuestro trabajo demuestra por primera vez la factibilidad de llevar a cabo terapia génica clonal basada en técnicas de edición génica en células madre epidérmicas de pacientes EBDR, abriendo el paso al desarrollo de protocolos clínicos con estándares de bioseguridad superiores a los previamente disponibles.

VI. CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo son las siguientes:

1. Para disponer de un modelo celular de EBDR útil para el desarrollo de terapias basadas en edición génica generamos la línea de queratinocitos de paciente inmortalizados RDEB-E67A6, portadora de la mutación recurrente c.6527insC en el gen *COL7A1*, presente en un alto porcentaje de los pacientes EBDR diagnosticados en población española. Las características de esta línea tanto *in vitro*, elevada proliferación y clonogenicidad, como *in vivo*, capacidad regenerativa y de diferenciación epidérmica, hacen que sea una herramienta muy útil en ensayos de corrección clonal de EBDR.
2. Hemos diseñado y construido herramientas moleculares para la corrección de la mutación c.6527insC mediante técnicas de edición génica, incluyendo nucleasas TALEN específicas para posiciones adyacentes a la mutación y construcciones para la corrección de la mutación mediante recombinación homóloga.
3. El empleo de vectores virales no integrativos, adenovirales para la expresión de nucleasas genómicas y AAVs para la introducción de las construcciones de *targeting*, nos permitió obtener altas frecuencias de corrección de la mutación c.6527insC mediante estrategias de recombinación homóloga. Los clones corregidos por esta estrategia presentaron re-expresión de colágeno VII a niveles fisiológicos.
4. La edición del gen *COL7A1* mediante la generación de *indels* por NHEJ constituye una alternativa de corrección altamente eficaz sin necesidad de selección con drogas. Un elevado porcentaje (20%) de clones de queratinocitos RDEB-E67A6 obtenidos tras la expresión de nucleasas TALENs portaban *indels* que resultaron en la síntesis de transcritos de *COL7A1* con recuperación del marco de lectura y en la expresión de variantes de colágeno VII carentes del exón 80 o con cambios limitados en la secuencia aminoacídica.
5. La implementación del protocolo de corrección por NHEJ en queratinocitos primarios de pacientes EBDR nos permitió conseguir clones individuales de células madre epidérmicas editadas que generaron piel humana expresando colágeno VII y con capacidad de persistencia a largo plazo tras su injerto en ratones inmunodeficientes. Este resultado abre el paso al desarrollo de protocolos clínicos para la corrección de EBDR mediante edición génica.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, J. D., Huang, Y., Liu, D., Hickey, R., Krause, D. S. & Giordano, F. J. (2004). Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation* **110**: 3300-3305.
- Alexeev, V., Uitto, J. & Igoucheva, O. (2011). Gene expression signatures of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the cutaneous environment and therapeutic implications for blistering skin disorder. *Cytotherapy* **13**: 30-45.
- Anders, C., Niewoehner, O., Duerst, A. & Jinek, M. (2014). Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature* **513**: 569-573.
- Baldeschi, C., Gache, Y., Rattenholl, A., Bouille, P., Danos, O., Ortonne, J. P., Bruckner-Tuderman, L. & Meneguzzi, G. (2003). Genetic correction of canine dystrophic epidermolysis bullosa mediated by retroviral vectors. *Hum Mol Genet* **12**: 1897-1905.
- Barbaro, V., Testa, A., Di Iorio, E., Mavilio, F., Pellegrini, G. & De Luca, M. (2007). C/EBPdelta regulates cell cycle and self-renewal of human limbal stem cells. *J Cell Biol* **177**: 1037-1049.
- Barrandon, Y. & Green, H. (1987). Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 2302-2306.
- Barrandon, Y., Li, V. & Green, H. (1988). New techniques for the grafting of cultured human epidermal cells onto athymic animals. *J Invest Dermatol* **91**: 315-318.
- Bessis, N., GarciaCozar, F. J. & Boissier, M. C. (2004). Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Ther* **11 Suppl 1**: S10-17.
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A. & Bonas, U. (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* **326**: 1509-1512.
- Bogdanove, A. J. & Voytas, D. F. (2011). TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. *Science* **333**: 1843-1846.
- Bornert, O., Kuhl, T., Bremer, J., van den Akker, P. C., Pasmooij, A. M. & Nystrom, A. (2016). Analysis of the functional consequences of targeted exon deletion in COL7A1 reveals prospects for dystrophic epidermolysis bullosa therapy. *Mol Ther* **24**: 1302-1311.
- Breitkreutz, D., Mirancea, N. & Nischt, R. (2009). Basement membranes in skin: unique matrix structures with diverse functions? *Histochem Cell Biol* **132**: 1-10.
- Bremer, J., Bornert, O., Nystrom, A., Gostynski, A., Jonkman, M. F., Aartsma-Rus, A., van den Akker, P. C. & Pasmooij, A. M. (2016). Antisense Oligonucleotide-mediated Exon Skipping as a Systemic Therapeutic Approach for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Mol Ther Nucleic Acids* **5**: e379.
- Bruckner-Tuderman, L. (2009). Can type VII collagen injections cure dystrophic epidermolysis bullosa? *Mol Ther* **17**: 6-7.
- Bruckner-Tuderman, L. (2010). Dystrophic epidermolysis bullosa: pathogenesis and clinical features. *Dermatol Clin* **28**: 107-114.
- Bruckner-Tuderman, L. (1999). Hereditary skin diseases of anchoring fibrils. *J Dermatol Sci* **20**: 122-133.
- Bruckner-Tuderman, L., Schnyder, U. W., Winterhalter, K. H. & Bruckner, P. (1987). Tissue form of type VII collagen from human skin and dermal fibroblasts in culture. *Eur J Biochem* **165**: 607-611.
- Cermak, T., Doyle, E. L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., Baller, J. A., Somia, N. V., Bogdanove, A. J. & Voytas, D. F. (2011). Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res* **39**: e82.

- Clayton, E., Doupe, D. P., Klein, A. M., Winton, D. J., Simons, B. D. & Jones, P. H. (2007). A single type of progenitor cell maintains normal epidermis. *Nature* **446**: 185-189.
- Colombo, M., Brittingham, R. J., Klement, J. F., Majsterek, I., Birk, D. E., Uitto, J. & Fertala, A. (2003). Procollagen VII self-assembly depends on site-specific interactions and is promoted by cleavage of the NC2 domain with procollagen C-proteinase. *Biochemistry* **42**: 11434-11442.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A. & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**: 819-823.
- Conget, P., Rodriguez, F., Kramer, S., Allers, C., Simon, V., Palisson, F., Gonzalez, S. & Yubero, M. J. (2010). Replenishment of type VII collagen and re-epithelialization of chronically ulcerated skin after intradermal administration of allogeneic mesenchymal stromal cells in two patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Cytotherapy* **12**: 429-431.
- Cox, D. B., Platt, R. J. & Zhang, F. (2015). Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med* **21**: 121-131.
- Cuthill, S., Agarwal, P., Sarkar, S., Savelieva, E. & Reznikoff, C. A. (1999). Dominant genetic alterations in immortalization: role for 20q gain. *Genes Chromosomes Cancer* **26**: 304-311.
- Chamcheu, J. C., Lorie, E. P., Akgul, B., Bannbers, E., Virtanen, M., Gammon, L., Moustakas, A., Navsaria, H., Vahlquist, A. & Torma, H. (2009). Characterization of immortalized human epidermolysis bullosa simplex (KRT5) cell lines: trimethylamine N-oxide protects the keratin cytoskeleton against disruptive stress condition. *J Dermatol Sci* **53**: 198-206.
- Chamorro, C., Mencia, A., Almarza, D., Duarte, B., Buning, H., Sallach, J., Hausser, I., Del Rio, M., Larcher, F. & Murillas, R. (2016). Gene Editing for the Efficient Correction of a Recurrent COL7A1 Mutation in Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa Keratinocytes. *Mol Ther Nucleic Acids* **5**: e307.
- Chapman, J. R., Taylor, M. R. & Boulton, S. J. (2012). Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell* **47**: 497-510.
- Chen, M., Kasahara, N., Keene, D. R., Chan, L., Hoeffler, W. K., Finlay, D., Barcova, M., Cannon, P. M., Mazurek, C. & Woodley, D. T. (2002). Restoration of type VII collagen expression and function in dystrophic epidermolysis bullosa. *Nat Genet* **32**: 670-675.
- Chen, M., O'Toole, E. A., Muellenhoff, M., Medina, E., Kasahara, N. & Woodley, D. T. (2000). Development and characterization of a recombinant truncated type VII collagen "minigene". Implication for gene therapy of dystrophic epidermolysis bullosa. *J Biol Chem* **275**: 24429-24435.
- Chen, X. & Goncalves, M. A. (2016). Engineered Viruses as Genome Editing Devices. *Mol Ther* **24**: 447-457.
- Cho, S. W., Kim, S., Kim, J. M. & Kim, J. S. (2013). Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol* **31**: 230-232.
- Christian, M., Cermak, T., Doyle, E. L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A. J. & Voytas, D. F. (2010). Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* **186**: 757-761.
- Christiano, A. M., Greenspan, D. S., Lee, S. & Uitto, J. (1994a). Cloning of human type VII collagen. Complete primary sequence of the alpha 1(VII) chain and identification of intragenic polymorphisms. *J Biol Chem* **269**: 20256-20262.
- Christiano, A. M., Hoffman, G. G., Chung-Honet, L. C., Lee, S., Cheng, W., Uitto, J. & Greenspan, D. S. (1994b). Structural organization of the human type VII collagen gene (COL7A1), composed of more exons than any previously characterized gene. *Genomics* **21**: 169-179.

- Christiano, A. M., Rosenbaum, L. M., Chung-Honet, L. C., Parente, M. G., Woodley, D. T., Pan, T. C., Zhang, R. Z., Chu, M. L., Burgeson, R. E. & Uitto, J. (1992). The large non-collagenous domain (NC-1) of type VII collagen is amino-terminal and chimeric. Homology to cartilage matrix protein, the type III domains of fibronectin and the A domains of von Willebrand factor. *Hum Mol Genet* **1**: 475-481.
- Chung, H. J. & Uitto, J. (2010). Type VII collagen: the anchoring fibril protein at fault in dystrophic epidermolysis bullosa. *Dermatol Clin* **28**: 93-105.
- Dale, B. A., Holbrook, K. A., Kimball, J. R., Hoff, M. & Sun, T. T. (1985). Expression of epidermal keratins and filaggrin during human fetal skin development. *J Cell Biol* **101**: 1257-1269.
- Dang, N. & Murrell, D. F. (2008). Mutation analysis and characterization of COL7A1 mutations in dystrophic epidermolysis bullosa. *Exp Dermatol* **17**: 553-568.
- Del Rio, M., Larcher, F., Serrano, F., Meana, A., Munoz, M., Garcia, M., Munoz, E., Martin, C., Bernad, A. & Jorcano, J. L. (2002). A preclinical model for the analysis of genetically modified human skin in vivo. *Hum Gene Ther* **13**: 959-968.
- Deng, D., Yan, C., Pan, X., Mahfouz, M., Wang, J., Zhu, J. K., Shi, Y. & Yan, N. (2012). Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science* **335**: 720-723.
- Ding, Q., Lee, Y. K., Schaefer, E. A., Peters, D. T., Veres, A., Kim, K., Kuperwasser, N., Motola, D. L., Meissner, T. B., Hendriks, W. T., Trevisan, M., Gupta, R. M., Moisan, A., Banks, E., Friesen, M., Schinzel, R. T., Xia, F., Tang, A., Xia, Y., Figueroa, E., Wann, A., Ahfeldt, T., Daheron, L., Zhang, F., Rubin, L. L., Peng, L. F., Chung, R. T., Musunuru, K. & Cowan, C. A. (2013). A TALEN genome-editing system for generating human stem cell-based disease models. *Cell Stem Cell* **12**: 238-251.
- Doudna, J. A. & Charpentier, E. (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* **346**: 1258096.
- Doyle, E. L., Booher, N. J., Standage, D. S., Voytas, D. F., Brendel, V. P., Vandyk, J. K. & Bogdanove, A. J. (2012). TAL Effector-Nucleotide Targeter (TALE-NT) 2.0: tools for TAL effector design and target prediction. *Nucleic Acids Res* **40**: W117-122.
- Droz-Georget Lathion, S., Rochat, A., Knott, G., Recchia, A., Martinet, D., Benmohammed, S., Grasset, N., Zaffalon, A., Besuchet Schmutz, N., Savioz-Dayer, E., Beckmann, J. S., Rougemont, J., Mavilio, F. & Barrandon, Y. (2015). A single epidermal stem cell strategy for safe ex vivo gene therapy. *EMBO Mol Med* **7**: 380-393.
- Duarte, B., Miselli, F., Murillas, R., Espinosa-Hevia, L., Cigudosa, J. C., Recchia, A., Del Rio, M. & Larcher, F. (2014). Long-term skin regeneration from a gene-targeted human epidermal stem cell clone. *Mol Ther* **22**: 1878-1880.
- Duensing, S., Lee, L. Y., Duensing, A., Basile, J., Piboonniyom, S., Gonzalez, S., Crum, C. P. & Munger, K. (2000). The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 10002-10007.
- El Hachem, M., Zambruno, G., Bourdon-Lanoy, E., Ciasulli, A., Buisson, C., Hadj-Rabia, S., Diociaiuti, A., Gouveia, C. F., Hernandez-Martin, A., de Lucas Laguna, R., Dolenc-Voljc, M., Tadini, G., Salvatori, G., De Ranieri, C., Leclerc-Mercier, S. & Bodemer, C. (2014). Multicentre consensus recommendations for skin care in inherited epidermolysis bullosa. *Orphanet J Rare Dis* **9**: 76.
- Escamez, M. J., Garcia, M., Cuadrado-Corrales, N., Llamas, S. G., Charlesworth, A., De Luca, N., Illera, N., Sanchez-Jimeno, C., Holguin, A., Duarte, B., Trujillo-Tiebas, M. J., Vicario, J. L., Santiago, J. L., Hernandez-Martin, A., Torrelo, A., Castiglia, D., Ayuso, C., Larcher, F., Jorcano, J. L., Meana, A., Meneguzzi, G., Zambruno, G. & Del Rio, M. (2010). The first COL7A1 mutation survey in a large Spanish dystrophic epidermolysis bullosa cohort: c.6527insC disclosed as an unusually recurrent mutation. *Br J Dermatol* **163**: 155-161.

- Fattah, F. J., Lichter, N. F., Fattah, K. R., Oh, S. & Hendrickson, E. A. (2008). Ku70, an essential gene, modulates the frequency of rAAV-mediated gene targeting in human somatic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 8703-8708.
- Fine, E. J., Cradick, T. J., Zhao, C. L., Lin, Y. & Bao, G. (2014a). An online bioinformatics tool predicts zinc finger and TALE nuclease off-target cleavage. *Nucleic Acids Res* **42**: e42.
- Fine, J. D., Bruckner-Tuderman, L., Eady, R. A., Bauer, E. A., Bauer, J. W., Has, C., Heagerty, A., Hintner, H., Hovnanian, A., Jonkman, M. F., Leigh, I., Marinkovich, M. P., Martinez, A. E., McGrath, J. A., Mellerio, J. E., Moss, C., Murrell, D. F., Shimizu, H., Uitto, J., Woodley, D. & Zambruno, G. (2014b). Inherited epidermolysis bullosa: updated recommendations on diagnosis and classification. *J Am Acad Dermatol* **70**: 1103-1126.
- Fine, J. D., Eady, R. A., Bauer, E. A., Bauer, J. W., Bruckner-Tuderman, L., Heagerty, A., Hintner, H., Hovnanian, A., Jonkman, M. F., Leigh, I., McGrath, J. A., Mellerio, J. E., Murrell, D. F., Shimizu, H., Uitto, J., Vahlquist, A., Woodley, D. & Zambruno, G. (2008). The classification of inherited epidermolysis bullosa (EB): Report of the Third International Consensus Meeting on Diagnosis and Classification of EB. *J Am Acad Dermatol* **58**: 931-950.
- Fritsch, A., Loeckermann, S., Kern, J. S., Braun, A., Bosl, M. R., Bley, T. A., Schumann, H., von Elverfeldt, D., Paul, D., Erlacher, M., Berens von Rautenfeld, D., Hausser, I., Fassler, R. & Bruckner-Tuderman, L. (2008). A hypomorphic mouse model of dystrophic epidermolysis bullosa reveals mechanisms of disease and response to fibroblast therapy. *J Clin Invest* **118**: 1669-1679.
- Frock, R. L., Hu, J., Meyers, R. M., Ho, Y. J., Kii, E. & Alt, F. W. (2015). Genome-wide detection of DNA double-stranded breaks induced by engineered nucleases. *Nat Biotechnol* **33**: 179-186.
- Fuchs, E. (1990). Epidermal differentiation. *Curr Opin Cell Biol* **2**: 1028-1035.
- Fuchs, E. (2008). Skin stem cells: rising to the surface. *J Cell Biol* **180**: 273-284.
- Fuchs, E. & Green, H. (1980). Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell* **19**: 1033-1042.
- Fuchs, E. & Horsley, V. (2008). More than one way to skin. *Genes Dev* **22**: 976-985.
- Gabriel, R., Lombardo, A., Arens, A., Miller, J. C., Genovese, P., Kaeppl, C., Nowrouzi, A., Bartholomae, C. C., Wang, J., Friedman, G., Holmes, M. C., Gregory, P. D., Glimm, H., Schmidt, M., Naldini, L. & von Kalle, C. (2011). An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity. *Nat Biotechnol* **29**: 816-823.
- Gache, Y., Baldeschi, C., Del Rio, M., Gagnoux-Palacios, L., Larcher, F., Lacour, J. P. & Meneguzzi, G. (2004). Construction of skin equivalents for gene therapy of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Hum Gene Ther* **15**: 921-933.
- Gagnon, J. A., Valen, E., Thyme, S. B., Huang, P., Akhmetova, L., Pauli, A., Montague, T. G., Zimmerman, S., Richter, C. & Schier, A. F. (2014). Efficient mutagenesis by Cas9 protein-mediated oligonucleotide insertion and large-scale assessment of single-guide RNAs. *PLoS One* **9**: e98186.
- Gaj, T., Epstein, B. E. & Schaffer, D. V. (2016). Genome Engineering Using Adeno-associated Virus: Basic and Clinical Research Applications. *Mol Ther* **24**: 458-464.
- Goncalves, M. A. (2005). A concise peer into the background, initial thoughts and practices of human gene therapy. *Bioessays* **27**: 506-517.
- Goto, M., Sawamura, D., Nishie, W., Sakai, K., McMillan, J. R., Akiyama, M. & Shimizu, H. (2006). Targeted skipping of a single exon harboring a premature termination codon mutation: implications and potential for gene correction therapy for selective dystrophic epidermolysis bullosa patients. *J Invest Dermatol* **126**: 2614-2620.

- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**: 59-74.
- Green, H. (2008). The birth of therapy with cultured cells. *Bioessays* **30**: 897-903.
- Hacein-Bey-Abina, S., Garrigue, A., Wang, G. P., Soulier, J., Lim, A., Morillon, E., Clappier, E., Caccavelli, L., Delabesse, E., Beldjord, K., Asnafi, V., MacIntyre, E., Dal Cortivo, L., Radford, I., Brousse, N., Sigaux, F., Moshous, D., Hauer, J., Borkhardt, A., Belohradsky, B. H., Wintergerst, U., Velez, M. C., Leiva, L., Sorensen, R., Wulffraat, N., Blanche, S., Bushman, F. D., Fischer, A. & Cavazzana-Calvo, M. (2008). Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest* **118**: 3132-3142.
- Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, P., Cohen, J. I., de Saint Basile, G., Alexander, I., Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D., Romana, S., Radford-Weiss, I., Gross, F., Valensi, F., Delabesse, E., Macintyre, E., Sigaux, F., Soulier, J., Leiva, L. E., Wissler, M., Prinz, C., Rabbitts, T. H., Le Deist, F., Fischer, A. & Cavazzana-Calvo, M. (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* **302**: 415-419.
- Halbert, C. L., Demers, G. W. & Galloway, D. A. (1991). The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J Virol* **65**: 473-478.
- Hendel, A., Fine, E. J., Bao, G. & Porteus, M. H. (2015). Quantifying on- and off-target genome editing. *Trends Biotechnol* **33**: 132-140.
- Hennings, H., Michael, D., Cheng, C., Steinert, P., Holbrook, K. & Yuspa, S. H. (1980). Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* **19**: 245-254.
- Hill, J. T., Demarest, B. L., Bisgrove, B. W., Su, Y. C., Smith, M. & Yost, H. J. (2014). Poly peak parser: Method and software for identification of unknown indels using sanger sequencing of polymerase chain reaction products. *Dev Dyn* **243**: 1632-1636.
- Hockemeyer, D., Soldner, F., Beard, C., Gao, Q., Mitalipova, M., DeKolver, R. C., Katibah, G. E., Amora, R., Boydston, E. A., Zeitler, B., Meng, X., Miller, J. C., Zhang, L., Rebar, E. J., Gregory, P. D., Urnov, F. D. & Jaenisch, R. (2009). Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* **27**: 851-857.
- Hockemeyer, D., Wang, H., Kiani, S., Lai, C. S., Gao, Q., Cassidy, J. P., Cost, G. J., Zhang, L., Santiago, Y., Miller, J. C., Zeitler, B., Cherone, J. M., Meng, X., Hinkley, S. J., Rebar, E. J., Gregory, P. D., Urnov, F. D. & Jaenisch, R. (2011). Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat Biotechnol* **29**: 731-734.
- Hsu, P. D., Lander, E. S. & Zhang, F. (2014a). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* **157**: 1262-1278.
- Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E. J., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T. J., Marraffini, L. A., Bao, G. & Zhang, F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol* **31**: 827-832.
- Hsu, Y. C., Li, L. & Fuchs, E. (2014b). Emerging interactions between skin stem cells and their niches. *Nat Med* **20**: 847-856.
- Itoh, M., Kiuru, M., Cairo, M. S. & Christiano, A. M. (2011). Generation of keratinocytes from normal and recessive dystrophic epidermolysis bullosa-induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 8797-8802.
- Jacobs, S. A., Roobrouck, V. D., Verfaillie, C. M. & Van Gool, S. W. (2013). Immunological characteristics of human mesenchymal stem cells and multipotent adult progenitor cells. *Immunol Cell Biol* **91**: 32-39.

- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**: 816-821.
- Jinek, M., East, A., Cheng, A., Lin, S., Ma, E. & Doudna, J. (2013). RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife* **2**: e00471.
- Juillerat, A., Dubois, G., Valton, J., Thomas, S., Stella, S., Marechal, A., Langevin, S., Benomari, N., Bertonati, C., Silva, G. H., Daboussi, F., Epinat, J. C., Montoya, G., Duclert, A. & Duchateau, P. (2014). Comprehensive analysis of the specificity of transcription activator-like effector nucleases. *Nucleic Acids Res* **42**: 5390-5402.
- Kalinin, A. E., Kajava, A. V. & Steinert, P. M. (2002). Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope. *Bioessays* **24**: 789-800.
- Kanitakis, J. (2002). Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol* **12**: 390-399; quiz 400-391.
- Kay, M. A. (2011). State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. *Nat Rev Genet* **12**: 316-328.
- Kay, M. A., Glorioso, J. C. & Naldini, L. (2001). Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med* **7**: 33-40.
- Kim, D., Bae, S., Park, J., Kim, E., Kim, S., Yu, H. R., Hwang, J., Kim, J. I. & Kim, J. S. (2015). Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. *Nat Methods* **12**: 237-243, 231 p following 243.
- Kim, H. & Kim, J. S. (2014). A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat Rev Genet* **15**: 321-334.
- Kim, Y. G., Cha, J. & Chandrasegaran, S. (1996). Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 1156-1160.
- Ko, M. S. & Marinkovich, M. P. (2010). Role of dermal-epidermal basement membrane zone in skin, cancer, and developmental disorders. *Dermatol Clin* **28**: 1-16.
- Kotterman, M. A. & Schaffer, D. V. (2014). Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nat Rev Genet* **15**: 445-451.
- Kovesdi, I. & Hedley, S. J. (2010). Adenoviral producer cells. *Viruses* **2**: 1681-1703.
- Larcher, F. & Del Rio, M. (2015). Innovative therapeutic strategies for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Actas Dermosifiliogr* **106**: 376-382.
- Larcher, F., Dellambra, E., Rico, L., Bondanza, S., Murillas, R., Cattoglio, C., Mavilio, F., Jorcano, J. L., Zambruno, G. & Del Rio, M. (2007). Long-term engraftment of single genetically modified human epidermal holoclones enables safety pre-assessment of cutaneous gene therapy. *Mol Ther* **15**: 1670-1676.
- Leigh, I. M., Eady, R. A., Heagerty, A. H., Purkis, P. E., Whitehead, P. A. & Burgeson, R. E. (1988). Type VII collagen is a normal component of epidermal basement membrane, which shows altered expression in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* **90**: 639-642.
- Leistner, D. M., Fischer-Rasokat, U., Honold, J., Seeger, F. H., Schachinger, V., Lehmann, R., Martin, H., Burck, I., Urbich, C., Dimmeler, S., Zeiher, A. M. & Assmus, B. (2011). Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): final 5-year results suggest long-term safety and efficacy. *Clin Res Cardiol* **100**: 925-934.
- Li, L., Atef, A., Piatek, A., Ali, Z., Piatek, M., Aouida, M., Sharakuu, A., Mahjoub, A., Wang, G., Khan, S., Fedoroff, N. V., Zhu, J. K. & Mahfouz, M. M. (2013). Characterization and DNA-binding specificities of Ralstonia TAL-like effectors. *Mol Plant* **6**: 1318-1330.

- Lim, X., Tan, S. H., Koh, W. L., Chau, R. M., Yan, K. S., Kuo, C. J., van Amerongen, R., Klein, A. M. & Nusse, R. (2013). Interfollicular epidermal stem cells self-renew via autocrine Wnt signaling. *Science* **342**: 1226-1230.
- Lin, Y. & Waldman, A. S. (2001). Capture of DNA sequences at double-strand breaks in mammalian chromosomes. *Genetics* **158**: 1665-1674.
- Lombardo, A., Genovese, P., Beausejour, C. M., Colleoni, S., Lee, Y. L., Kim, K. A., Ando, D., Urnov, F. D., Galli, C., Gregory, P. D., Holmes, M. C. & Naldini, L. (2007). Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nat Biotechnol* **25**: 1298-1306.
- Llames, S. G., Del Rio, M., Larcher, F., Garcia, E., Garcia, M., Escamez, M. J., Jorcano, J. L., Holguin, P. & Meana, A. (2004). Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. *Transplantation* **77**: 350-355.
- Maeder, M. L. & Gersbach, C. A. (2016). Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy. *Mol Ther* **24**: 430-446.
- Maeder, M. L., Thibodeau-Beganny, S., Osiak, A., Wright, D. A., Anthony, R. M., Eichinger, M., Jiang, T., Foley, J. E., Winfrey, R. J., Townsend, J. A., Unger-Wallace, E., Sander, J. D., Muller-Lerch, F., Fu, F., Pearlberg, J., Gobel, C., Dassie, J. P., Pruett-Miller, S. M., Porteus, M. H., Sgroi, D. C., Iafrate, A. J., Dobbs, D., McCray, P. B., Jr., Cathomen, T., Voytas, D. F. & Joung, J. K. (2008). Rapid "open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. *Mol Cell* **31**: 294-301.
- Maggio, I. & Goncalves, M. A. (2015). Genome editing at the crossroads of delivery, specificity, and fidelity. *Trends Biotechnol* **33**: 280-291.
- Majhen, D., Calderon, H., Chandra, N., Fajardo, C. A., Rajan, A., Alemany, R. & Custers, J. (2014). Adenovirus-based vaccines for fighting infectious diseases and cancer: progress in the field. *Hum Gene Ther* **25**: 301-317.
- Mak, A. N., Bradley, P., Cernadas, R. A., Bogdanove, A. J. & Stoddard, B. L. (2012). The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. *Science* **335**: 716-719.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E. & Church, G. M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* **339**: 823-826.
- Mathor, M. B., Ferrari, G., Dellambra, E., Cilli, M., Mavilio, F., Cancedda, R. & De Luca, M. (1996). Clonal analysis of stably transduced human epidermal stem cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 10371-10376.
- McGrath, J. A., Ashton, G. H., Mellerio, J. E., Salas-Alanis, J. C., Swensson, O., McMillan, J. R. & Eady, R. A. (1999). Moderation of phenotypic severity in dystrophic and junctional forms of epidermolysis bullosa through in-frame skipping of exons containing non-sense or frameshift mutations. *J Invest Dermatol* **113**: 314-321.
- Mecklenbeck, S., Compton, S. H., Mejia, J. E., Cervini, R., Hovnanian, A., Bruckner-Tuderman, L. & Barrandon, Y. (2002). A microinjected COL7A1-PAC vector restores synthesis of intact procollagen VII in a dystrophic epidermolysis bullosa keratinocyte cell line. *Hum Gene Ther* **13**: 1655-1662.
- Mehrel, T., Hohl, D., Rothnagel, J. A., Longley, M. A., Bundman, D., Cheng, C., Lichti, U., Bisher, M. E., Steven, A. C., Steinert, P. M. & et al. (1990). Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin. *Cell* **61**: 1103-1112.
- Mellerio, J. E., Robertson, S. J., Bernardis, C., Diem, A., Fine, J. D., George, R., Goldberg, D., Halmos, G. B., Harries, M., Jonkman, M. F., Lucky, A., Martinez, A. E., Maubec, E., Morris, S., Murrell, D. F., Palisson, F., Pillay, E. I., Robson, A., Salas-Alanis, J. C. & McGrath, J. A. (2016). Management of

- cutaneous squamous cell carcinoma in patients with epidermolysis bullosa: best clinical practice guidelines. *Br J Dermatol* **174**: 56-67.
- Miller, D. G., Petek, L. M. & Russell, D. W. (2004). Adeno-associated virus vectors integrate at chromosome breakage sites. *Nat Genet* **36**: 767-773.
- Miller, J. C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K. A., Wang, J., Xia, D. F., Meng, X., Paschon, D. E., Leung, E., Hinkley, S. J., Dulay, G. P., Hua, K. L., Ankoudinova, I., Cost, G. J., Urnov, F. D., Zhang, H. S., Holmes, M. C., Zhang, L., Gregory, P. D. & Rebar, E. J. (2011). A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol* **29**: 143-148.
- Miller, J. C., Zhang, L., Xia, D. F., Campo, J. J., Ankoudinova, I. V., Guschin, D. Y., Babiarz, J. E., Meng, X., Hinkley, S. J., Lam, S. C., Paschon, D. E., Vincent, A. I., Dulay, G. P., Barlow, K. A., Shivak, D. A., Leung, E., Kim, J. D., Amora, R., Urnov, F. D., Gregory, P. D. & Rebar, E. J. (2015). Improved specificity of TALE-based genome editing using an expanded RVD repertoire. *Nat Methods* **12**: 465-471.
- Mingozzi, F. & High, K. A. (2013). Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood* **122**: 23-36.
- Moehle, E. A., Rock, J. M., Lee, Y. L., Jouvenot, Y., DeKolver, R. C., Gregory, P. D., Urnov, F. D. & Holmes, M. C. (2007). Targeted gene addition into a specified location in the human genome using designed zinc finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 3055-3060.
- Morley, S. M., D'Alessandro, M., Sexton, C., Rugg, E. L., Navsaria, H., Shemanko, C. S., Huber, M., Hohl, D., Heagerty, A. I., Leigh, I. M. & Lane, E. B. (2003). Generation and characterization of epidermolysis bullosa simplex cell lines: scratch assays show faster migration with disruptive keratin mutations. *Br J Dermatol* **149**: 46-58.
- Moscou, M. J. & Bogdanove, A. J. (2009). A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* **326**: 1501.
- Mussolino, C., Alzubi, J., Fine, E. J., Morbitzer, R., Cradick, T. J., Lahaye, T., Bao, G. & Cathomen, T. (2014). TALENs facilitate targeted genome editing in human cells with high specificity and low cytotoxicity. *Nucleic Acids Res* **42**: 6762-6773.
- Mussolino, C., Morbitzer, R., Lutge, F., Dannemann, N., Lahaye, T. & Cathomen, T. (2011). A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Res* **39**: 9283-9293.
- Ng, P., Parks, R. J., Cummings, D. T., Eveleigh, C. M. & Graham, F. L. (2000). An enhanced system for construction of adenoviral vectors by the two-plasmid rescue method. *Hum Gene Ther* **11**: 693-699.
- Nuschke, A. (2014). Activity of mesenchymal stem cells in therapies for chronic skin wound healing. *Organogenesis* **10**: 29-37.
- Ohbayashi, F., Balamotis, M. A., Kishimoto, A., Aizawa, E., Diaz, A., Hasty, P., Graham, F. L., Caskey, C. T. & Mitani, K. (2005). Correction of chromosomal mutation and random integration in embryonic stem cells with helper-dependent adenoviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 13628-13633.
- Ortiz-Urda, S., Lin, Q., Green, C. L., Keene, D. R., Marinkovich, M. P. & Khavari, P. A. (2003). Injection of genetically engineered fibroblasts corrects regenerated human epidermolysis bullosa skin tissue. *J Clin Invest* **111**: 251-255.
- Ortiz-Urda, S., Thyagarajan, B., Keene, D. R., Lin, Q., Fang, M., Calos, M. P. & Khavari, P. A. (2002). Stable nonviral genetic correction of inherited human skin disease. *Nat Med* **8**: 1166-1170.
- Osborn, M. J., Starker, C. G., McElroy, A. N., Webber, B. R., Riddle, M. J., Xia, L., DeFeo, A. P., Gabriel, R., Schmidt, M., von Kalle, C., Carlson, D. F., Maeder, M. L., Joung, J. K., Wagner, J. E., Voytas, D.

- F., Blazar, B. R. & Tolar, J. (2013). TALEN-based gene correction for epidermolysis bullosa. *Mol Ther* **21**: 1151-1159.
- Ousterout, D. G., Kabadi, A. M., Thakore, P. I., Perez-Pinera, P., Brown, M. T., Majoros, W. H., Reddy, T. E. & Gersbach, C. A. (2015). Correction of dystrophin expression in cells from duchenne muscular dystrophy patients through genomic excision of exon 51 by zinc finger nucleases. *Mol Ther* **23**: 523-532.
- Ousterout, D. G., Perez-Pinera, P., Thakore, P. I., Kabadi, A. M., Brown, M. T., Qin, X., Fedrigo, O., Mouly, V., Tremblay, J. P. & Gersbach, C. A. (2013). Reading frame correction by targeted genome editing restores dystrophin expression in cells from Duchenne muscular dystrophy patients. *Mol Ther* **21**: 1718-1726.
- Parente, M. G., Chung, L. C., Ryyanen, J., Woodley, D. T., Wynn, K. C., Bauer, E. A., Mattei, M. G., Chu, M. L. & Uitto, J. (1991). Human type VII collagen: cDNA cloning and chromosomal mapping of the gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 6931-6935.
- Pattanayak, V., Ramirez, C. L., Joung, J. K. & Liu, D. R. (2011). Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection. *Nat Methods* **8**: 765-770.
- Pellegrini, G., Bondanza, S., Guerra, L. & De Luca, M. (1998). Cultivation of human keratinocyte stem cells: current and future clinical applications. *Med Biol Eng Comput* **36**: 778-790.
- Perdoni, C., McGrath, J. A. & Tolar, J. (2014). Preconditioning of mesenchymal stem cells for improved transplantation efficacy in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Stem Cell Res Ther* **5**: 121.
- Perdoni, C., Osborn, M. J. & Tolar, J. (2016). Gene editing toward the use of autologous therapies in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Transl Res* **168**: 50-58.
- Perdoni, C., Osborn, M. J. & Tolar, J. (2015). Gene editing toward the use of autologous therapies in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Transl Res*.
- Petrof, G., Martinez-Queipo, M., Mellerio, J. E., Kemp, P. & McGrath, J. A. (2013). Fibroblast cell therapy enhances initial healing in recessive dystrophic epidermolysis bullosa wounds: results of a randomized, vehicle-controlled trial. *Br J Dermatol* **169**: 1025-1033.
- Porteus, M. H. (2015). Towards a new era in medicine: therapeutic genome editing. *Genome Biol* **16**: 286.
- Porteus, M. H. & Carroll, D. (2005). Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nat Biotechnol* **23**: 967-973.
- Potten, C. S. (1974). The epidermal proliferative unit: the possible role of the central basal cell. *Cell Tissue Kinet* **7**: 77-88.
- Qi, Y., Jiang, D., Sindrilaru, A., Stegemann, A., Schatz, S., Treiber, N., Rojewski, M., Schrezenmeier, H., Vander Beken, S., Wlaschek, M., Bohm, M., Seitz, A., Scholz, N., Durselen, L., Brinckmann, J., Ignatius, A. & Scharffetter-Kochanek, K. (2014). TSG-6 released from intradermally injected mesenchymal stem cells accelerates wound healing and reduces tissue fibrosis in murine full-thickness skin wounds. *J Invest Dermatol* **134**: 526-537.
- Qiu, P., Shandilya, H., D'Alessio, J. M., O'Connor, K., Durocher, J. & Gerard, G. F. (2004). Mutation detection using Surveyor nuclease. *Biotechniques* **36**: 702-707.
- Ran, F. A., Cong, L., Yan, W. X., Scott, D. A., Gootenberg, J. S., Kriz, A. J., Zetsche, B., Shalem, O., Wu, X., Makarova, K. S., Koonin, E. V., Sharp, P. A. & Zhang, F. (2015). In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9. *Nature* **520**: 186-191.
- Remington, J., Wang, X., Hou, Y., Zhou, H., Burnett, J., Muirhead, T., Uitto, J., Keene, D. R., Woodley, D. T. & Chen, M. (2009). Injection of recombinant human type VII collagen corrects the disease phenotype in a murine model of dystrophic epidermolysis bullosa. *Mol Ther* **17**: 26-33.

- Reyon, D., Tsai, S. Q., Khayter, C., Foden, J. A., Sander, J. D. & Joung, J. K. (2012). FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nat Biotechnol* **30**: 460-465.
- Richer, B. C. & Seeger, K. (2014). The hinge region of type VII collagen is intrinsically disordered. *Matrix Biol* **36**: 77-83.
- Richter, A., Streubel, J. & Boch, J. (2016). TAL Effector DNA-Binding Principles and Specificity. *Methods Mol Biol* **1338**: 9-25.
- Rodgers, K. & McVey, M. (2016). Error-Prone Repair of DNA Double-Strand Breaks. *J Cell Physiol* **231**: 15-24.
- Rothkamm, K., Kruger, I., Thompson, L. H. & Lobrich, M. (2003). Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* **23**: 5706-5715.
- Rouet, P., Smih, F. & Jasin, M. (1994). Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Mol Cell Biol* **14**: 8096-8106.
- Russell, D. W. & Hirata, R. K. (1998). Human gene targeting by viral vectors. *Nat Genet* **18**: 325-330.
- Russell, S. J., Peng, K. W. & Bell, J. C. (2012). Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol* **30**: 658-670.
- Ryynanen, J., Sollberg, S., Parente, M. G., Chung, L. C., Christiano, A. M. & Uitto, J. (1992). Type VII collagen gene expression by cultured human cells and in fetal skin. Abundant mRNA and protein levels in epidermal keratinocytes. *J Clin Invest* **89**: 163-168.
- Ryynanen, M., Knowlton, R. G., Parente, M. G., Chung, L. C., Chu, M. L. & Uitto, J. (1991). Human type VII collagen: genetic linkage of the gene (COL7A1) on chromosome 3 to dominant dystrophic epidermolysis bullosa. *Am J Hum Genet* **49**: 797-803.
- Saelman, E. U., Nieuwenhuis, H. K., Hese, K. M., de Groot, P. G., Heijnen, H. F., Sage, E. H., Williams, S., McKeown, L., Gralnick, H. R. & Sixma, J. J. (1994). Platelet adhesion to collagen types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa (alpha 2 beta 1-integrin). *Blood* **83**: 1244-1250.
- Sakai, L. Y., Keene, D. R., Morris, N. P. & Burgeson, R. E. (1986). Type VII collagen is a major structural component of anchoring fibrils. *J Cell Biol* **103**: 1577-1586.
- Sawamura, D., Yasukawa, K., Kodama, K., Yokota, K., Sato-Matsumura, K. C., Toshihiro, T. & Shimizu, H. (2002). The majority of keratinocytes incorporate intradermally injected plasmid DNA regardless of size but only a small proportion of cells can express the gene product. *J Invest Dermatol* **118**: 967-971.
- Schmid-Burgk, J. L., Schmidt, T., Kaiser, V., Honing, K. & Hornung, V. (2013). A ligation-independent cloning technique for high-throughput assembly of transcription activator-like effector genes. *Nat Biotechnol* **31**: 76-81.
- Sebastiano, V., Maeder, M. L., Angstman, J. F., Haddad, B., Khayter, C., Yeo, D. T., Goodwin, M. J., Hawkins, J. S., Ramirez, C. L., Batista, L. F., Artandi, S. E., Wernig, M. & Joung, J. K. (2011). In situ genetic correction of the sickle cell anemia mutation in human induced pluripotent stem cells using engineered zinc finger nucleases. *Stem Cells* **29**: 1717-1726.
- Sebastiano, V., Zhen, H. H., Haddad, B., Bashkirova, E., Melo, S. P., Wang, P., Leung, T. L., Siprashvili, Z., Tichy, A., Li, J., Ameen, M., Hawkins, J., Lee, S., Li, L., Schwertschkow, A., Bauer, G., Lisowski, L., Kay, M. A., Kim, S. K., Lane, A. T., Wernig, M. & Oro, A. E. (2014). Human COL7A1-corrected induced pluripotent stem cells for the treatment of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Sci Transl Med* **6**: 264ra163.
- Sedivy, J. M. & Dutriaux, A. (1999). Gene targeting and somatic cell genetics--a rebirth or a coming of age? *Trends Genet* **15**: 88-90.

- Silva, G., Poirot, L., Galetto, R., Smith, J., Montoya, G., Duchateau, P. & Paques, F. (2011). Meganucleases and other tools for targeted genome engineering: perspectives and challenges for gene therapy. *Curr Gene Ther* **11**: 11-27.
- Siprashvili, Z., Nguyen, N. T., Bezchinsky, M. Y., Marinkovich, M. P., Lane, A. T. & Khavari, P. A. (2010). Long-term type VII collagen restoration to human epidermolysis bullosa skin tissue. *Hum Gene Ther* **21**: 1299-1310.
- Smih, F., Rouet, P., Romanienko, P. J. & Jasin, M. (1995). Double-strand breaks at the target locus stimulate gene targeting in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* **23**: 5012-5019.
- Smith, J., Bibikova, M., Whitby, F. G., Reddy, A. R., Chandrasegaran, S. & Carroll, D. (2000). Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains. *Nucleic Acids Res* **28**: 3361-3369.
- Smithies, O., Gregg, R. G., Boggs, S. S., Koralewski, M. A. & Kucherlapati, R. S. (1985). Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature* **317**: 230-234.
- Soldner, F., Laganieri, J., Cheng, A. W., Hockemeyer, D., Gao, Q., Alagappan, R., Khurana, V., Golbe, L. I., Myers, R. H., Lindquist, S., Zhang, L., Guschin, D., Fong, L. K., Vu, B. J., Meng, X., Urnov, F. D., Rebar, E. J., Gregory, P. D., Zhang, H. S. & Jaenisch, R. (2011). Generation of isogenic pluripotent stem cells differing exclusively at two early onset Parkinson point mutations. *Cell* **146**: 318-331.
- Sonntag, F., Schmidt, K. & Kleinschmidt, J. A. (2010). A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 10220-10225.
- Stanley, J. R. & Yuspa, S. H. (1983). Specific epidermal protein markers are modulated during calcium-induced terminal differentiation. *J Cell Biol* **96**: 1809-1814.
- Suzuki, D. & Senoo, M. (2012). Increased p63 phosphorylation marks early transition of epidermal stem cells to progenitors. *J Invest Dermatol* **132**: 2461-2464.
- Tebas, P., Stein, D., Tang, W. W., Frank, I., Wang, S. Q., Lee, G., Spratt, S. K., Surosky, R. T., Giedlin, M. A., Nichol, G., Holmes, M. C., Gregory, P. D., Ando, D. G., Kalos, M., Collman, R. G., Binder-Scholl, G., Plesa, G., Hwang, W. T., Levine, B. L. & June, C. H. (2014). Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N Engl J Med* **370**: 901-910.
- Thomas, C. E., Ehrhardt, A. & Kay, M. A. (2003). Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* **4**: 346-358.
- Tolar, J., Ishida-Yamamoto, A., Riddle, M., McElmurry, R. T., Osborn, M., Xia, L., Lund, T., Slaterry, C., Uitto, J., Christiano, A. M., Wagner, J. E. & Blazar, B. R. (2009). Amelioration of epidermolysis bullosa by transfer of wild-type bone marrow cells. *Blood* **113**: 1167-1174.
- Tolar, J. & Wagner, J. E. (2013). Allogeneic blood and bone marrow cells for the treatment of severe epidermolysis bullosa: repair of the extracellular matrix. *Lancet* **382**: 1214-1223.
- Tolar, J. & Wagner, J. E. (2012). Management of severe epidermolysis bullosa by haematopoietic transplant: principles, perspectives and pitfalls. *Exp Dermatol* **21**: 896-900.
- Tolar, J., Xia, L., Riddle, M. J., Lees, C. J., Eide, C. R., McElmurry, R. T., Titeux, M., Osborn, M. J., Lund, T. C., Hovnanian, A., Wagner, J. E. & Blazar, B. R. (2011). Induced pluripotent stem cells from individuals with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* **131**: 848-856.
- Toyonaga, E., Nishie, W., Komine, M., Murata, S., Shinkuma, S., Natsuga, K., Nakamura, H., Ohtsuki, M. & Shimizu, H. (2015). Skipped exon in COL7A1 determines the clinical phenotypes of dystrophic epidermolysis bullosa. *Br J Dermatol* **172**: 1141-1144.

- Tsai, S. Q., Zheng, Z., Nguyen, N. T., Liebers, M., Topkar, V. V., Thapar, V., Wyvekens, N., Khayter, C., Iafrate, A. J., Le, L. P., Aryee, M. J. & Joung, J. K. (2015). GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat Biotechnol* **33**: 187-197.
- Tse, L. V., Moller-Tank, S. & Asokan, A. (2015). Strategies to circumvent humoral immunity to adeno-associated viral vectors. *Expert Opin Biol Ther* **15**: 845-855.
- Tsuruta, D., Hashimoto, T., Hamill, K. J. & Jones, J. C. (2011). Hemidesmosomes and focal contact proteins: functions and cross-talk in keratinocytes, bullous diseases and wound healing. *J Dermatol Sci* **62**: 1-7.
- Turczynski, S., Titeux, M., Tonasso, L., Decha, A., Ishida-Yamamoto, A. & Hovnanian, A. (2016). Targeted Exon Skipping Restores Type VII Collagen Expression and Anchoring Fibril Formation in an In Vivo RDEB Model. *J Invest Dermatol*.
- Uitto, J. (2008). The role of elastin and collagen in cutaneous aging: intrinsic aging versus photoexposure. *J Drugs Dermatol* **7**: s12-16.
- Uitto, J., Bruckner-Tuderman, L., Christiano, A. M., McGrath, J. A., Has, C., South, A. P., Kopelan, B. & Robinson, E. C. (2016). Progress toward Treatment and Cure of Epidermolysis Bullosa: Summary of the DEBRA International Research Symposium EB2015. *J Invest Dermatol* **136**: 352-358.
- Urnov, F. D., Miller, J. C., Lee, Y. L., Beausejour, C. M., Rock, J. M., Augustus, S., Jamieson, A. C., Porteus, M. H., Gregory, P. D. & Holmes, M. C. (2005). Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* **435**: 646-651.
- Urnov, F. D., Rebar, E. J., Holmes, M. C., Zhang, H. S. & Gregory, P. D. (2010). Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet* **11**: 636-646.
- Van Agtmael, T. & Bruckner-Tuderman, L. (2010). Basement membranes and human disease. *Cell Tissue Res* **339**: 167-188.
- Varki, R., Sadowski, S., Uitto, J. & Pfendner, E. (2007). Epidermolysis bullosa. II. Type VII collagen mutations and phenotype-genotype correlations in the dystrophic subtypes. *J Med Genet* **44**: 181-192.
- Wagner, J. E., Ishida-Yamamoto, A., McGrath, J. A., Hordinsky, M., Keene, D. R., Woodley, D. T., Chen, M., Riddle, M. J., Osborn, M. J., Lund, T., Dolan, M., Blazar, B. R. & Tolar, J. (2010). Bone marrow transplantation for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *N Engl J Med* **363**: 629-639.
- Watt, F. M. (1989). Terminal differentiation of epidermal keratinocytes. *Curr Opin Cell Biol* **1**: 1107-1115.
- Weitzman, M. D., Kyostio, S. R., Kotin, R. M. & Owens, R. A. (1994). Adeno-associated virus (AAV) Rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 5808-5812.
- Wong, T., Gammon, L., Liu, L., Mellerio, J. E., Dopping-Hepenstal, P. J., Pacy, J., Elia, G., Jeffery, R., Leigh, I. M., Navsaria, H. & McGrath, J. A. (2008). Potential of fibroblast cell therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* **128**: 2179-2189.
- Woodley, D. T., Keene, D. R., Atha, T., Huang, Y., Lipman, K., Li, W. & Chen, M. (2004a). Injection of recombinant human type VII collagen restores collagen function in dystrophic epidermolysis bullosa. *Nat Med* **10**: 693-695.
- Woodley, D. T., Keene, D. R., Atha, T., Huang, Y., Ram, R., Kasahara, N. & Chen, M. (2004b). Intradermal injection of lentiviral vectors corrects regenerated human dystrophic epidermolysis bullosa skin tissue in vivo. *Mol Ther* **10**: 318-326.

- Woodley, D. T., Krueger, G. G., Jorgensen, C. M., Fairley, J. A., Atha, T., Huang, Y., Chan, L., Keene, D. R. & Chen, M. (2003). Normal and gene-corrected dystrophic epidermolysis bullosa fibroblasts alone can produce type VII collagen at the basement membrane zone. *J Invest Dermatol* **121**: 1021-1028.
- Woodley, D. T., Remington, J., Huang, Y., Hou, Y., Li, W., Keene, D. R. & Chen, M. (2007). Intravenously injected human fibroblasts home to skin wounds, deliver type VII collagen, and promote wound healing. *Mol Ther* **15**: 628-635.
- Woodley, D. T., Wang, X., Amir, M., Hwang, B., Remington, J., Hou, Y., Uitto, J., Keene, D. & Chen, M. (2013). Intravenously injected recombinant human type VII collagen homes to skin wounds and restores skin integrity of dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* **133**: 1910-1913.
- Wu, X., Li, Y., Crise, B. & Burgess, S. M. (2003). Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* **300**: 1749-1751.
- Wyman, C. & Kanaar, R. (2006). DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu Rev Genet* **40**: 363-383.
- Zou, J., Maeder, M. L., Mali, P., Pruett-Miller, S. M., Thibodeau-Beganny, S., Chou, B. K., Chen, G., Ye, Z., Park, I. H., Daley, G. Q., Porteus, M. H., Joung, J. K. & Cheng, L. (2009). Gene targeting of a disease-related gene in human induced pluripotent stem and embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* **5**: 97-110.

VIII. PUBLICACIONES

response for cathelicidin, and to a lesser (but not statistically significant) degree, TLR-9 in lesional skin. This finding supports the role that wounding may play in psoriasis induction and suggests that one factor affecting the efficacy of etanercept may be the blunting of this wounding response. Further studies with larger sample sizes, immunohistochemistry and qRT-PCR data are necessary to confirm this novel preliminary finding.

Author contributions

TH, MA, JM, MJ, DTA, PFK, FK, MG, RLG performed the research. MA, AMT, YL analysed the data. TH, RLG designed the study and wrote the manuscript.

Conflict of interests

Amgen (Thousand Oaks, CA) funded an investigator-initiated grant supporting this research. The authors have declared no conflicting interests.

References

- Ong P Y, Ohtake T, Brandt C *et al.* *N Engl J Med* 2002; **347**: 1151–1160.
- Nomura I, Goleva E, Howell M D *et al.* *J Immunol* 2003; **171**: 3262–3269.
- Howell M D, Novak N, Bieber T *et al.* *J Invest Dermatol* 2005; **125**: 738–745.
- Yamasaki K, Di Nardo A, Bardan A *et al.* *Nat Med* 2007; **13**: 975–980.
- Schauber J, Dorschner R A, Coda A B *et al.* *J Clin Invest* 2007; **117**: 803–811.
- Lande R, Gregorio J, Facchinetti V *et al.* *Nature* 2007; **449**: 564–569.
- Dombrowski Y, Schaub J. *Exp Dermatol* 2012; **21**: 327–330.
- Zaba L C, Cardinale I, Gilleaudeau P *et al.* *J Exp Med* 2007; **204**: 3183–3194.
- Guttman-Yassky E, Nogales K E, Krueger J G. *J Allergy Clin Immunol* 2011; **127**: 1420–1432.
- Kim B J, Rho Y K, Lee H I *et al.* *Clin Dev Immunol* 2009; **2009**: 645898.
- Peric M, Koglin S, Kim S *et al.* *J Immunol* 2008; **181**: 8504–8512.
- Bose F, Raeli L, Garutti C *et al.* *Clin Immunol* 2011; **139**: 164–176.
- Morizane S, Yamasaki K, Muhleisen B *et al.* *J Invest Dermatol* 2012; **132**: 135–143.
- Gambichler T, Kobus S, Kobus A *et al.* *Regul Pept* 2011; **167**: 163–166.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Data S1. Quantitative real-time PCR.

Data S2. Statistical supplement for figure 1B, 1E and 2E.

DOI: 10.1111/exd.12203

www.wileyonlinelibrary.com/journal/EXD

Letter to the Editor

Keratinocyte cell lines derived from severe generalized recessive Epidermolysis Bullosa patients carrying a highly recurrent *COL7A1* homozygous mutation: models to assess cell and gene therapies *in vitro* and *in vivo*

Cristina Chamorro^{1*}, David Almaraz^{1*}, Blanca Duarte^{1,2}, Sara G. Llames², Rodolfo Murillas^{1,2}, Marta García^{2,3}, Juan C. Cigudosa⁴, Luis Espinosa-Hevia⁴, María José Escámez^{1,2,3}, Ángeles Mencía³, Álvaro Meana², Ramón García-Escudero⁵, Rosa Moro¹, Claudio J. Conti^{3,6}, Marcela Del Río^{1,2,3} and Fernando Larcher^{1,2,3}

¹Epithelial Biomedicine Division, Cutaneous Disease Modelling Unit, CIEMAT, Madrid, Spain; ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER- U714), Madrid, Spain; ³Department of Bioengineering, Universidad Carlos III de Madrid, Madrid, Spain; ⁴Centro de Investigaciones Oncológicas, Molecular Cytogenetics Group, Human Cancer Genetics Program, Spanish National Cancer Research Centre (CNIO-CIBERER), Madrid, Spain; ⁵Molecular Oncology Unit, CIEMAT, Madrid, Spain; ⁶Department of Molecular and Cellular Medicine, Texas A&M Health Science Center, College Station, TX, USA

Correspondence: Fernando Larcher and Marcela Del Río, Epithelial Biomedicine Division, Cutaneous Disease Modelling Unit, CIEMAT-Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER- U714), Madrid, Spain, Tel.: 34-91-4962527, Fax: 34-913466484, e-mails: fernando.larcher@ciemat.es; marcela.delrio@uc3m.es

*These two authors equally contributed to this work

Abstract: Recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB) is caused by deficiency of type VII collagen due to *COL7A1* mutations such as c.6527insC, recurrently found in the Spanish RDEB population. Assessment of clonal correction-based therapeutic approaches for RDEB requires large expansions of cells, exceeding the replication capacity of human primary keratinocytes. Thus, immortalized RDEB cells with enhanced proliferative abilities would be valuable. Using either the SV40 large T antigen or papillomavirus HPV16-derived E6-E7 proteins, we immortalized and cloned RDEB keratinocytes carrying the c.6527insC mutation. Clones exhibited high

proliferative and colony-forming features. Cytogenetic analysis revealed important differences between T antigen-driven and E6-E7-driven immortalization. Immortalized cells responded to differentiation stimuli and were competent for epidermal regeneration and recapitulation of the blistering RDEB phenotype *in vivo*. These features make these cell lines useful to test novel therapeutic approaches including those aimed at editing mutant *COL7A1*.

Key words: cell lines – genodermatoses – keratinocytes – viral oncogenes

Accepted for publication 25 June 2013

Background

Recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB) is a devastating mechanobullous genodermatosis whose severity and classification depend on the extent of type VII collagen deficiency (1). Null *COL7A1* mutations give rise to the severe generalized RDEB form (2). We have recently disclosed c.6527insC as a highly recurrent *COL7A1* mutation affecting around 50% of the Spanish RDEB population (3,4). Several therapeutic approaches for RDEB, including protein, cell and gene therapies, are currently being explored at preclinical and clinical stages (5,6). Although feasible through retroviral gene transfer (7), *ex vivo* gene therapy is evolving towards safer standards (8) requiring suitable test systems such as the immortalized cells herein described.

Questions addressed

Recurrent *COL7A1* mutations such as c.6527insC are susceptible of tailored therapeutic strategies including homologous recombination, RNA trans-splicing or exon skipping, which nowadays remain inefficient. Evaluation of these approaches relies on the *in vitro* analysis of large number of cells and on stringent assays dealing with skin regenerative capacity of the modified cells *in vivo* (9–11). Although immortalized keratinocyte cell lines derived from several genodermatoses, including RDEB, have been reported (12–15), detailed characterization of the immortalization process, growth performance, cytogenetic status and skin regenerative capacity has not been thoroughly addressed.

Experimental design

Immortalization of keratinocytes derived from two RDEB patients carrying the c.6527insC *COL7A1* mutation was performed by retroviral transduction of either the SV40 virus large T antigen or papillomavirus-derived E6-E7 proteins (16,17). We designed experiments to comparatively characterize the immortalized cells with respect to proliferation, clonogenicity, differentiation and karyotype. We also tested their regenerative performance and capacity to recapitulate the RDEB disease phenotype *in vivo*. (For details see Appendix S1).

Results

RDEB Keratinocyte immortalization

Large T antigen- or E6E7-transduced cells (named RDEB-T and RDEB-E67, respectively) grew originally in the presence of 3T3 feeder layer. After approximately 25 population doublings, polyclonal cells became independent of feeder cells without apparent signs of proliferative crisis. Clones of both cells were isolated. Studies were continued with two clones, RDEB-TA4 and RDEB-E67A6, derived, respectively, from RDEB-T and RDEB-E67 parental cells. Both clones showed typical keratinocyte morphology (Figure S1a). Expression of the corresponding immortalization proteins and their concomitant activity on retinoblastoma protein degradation were confirmed (Figure S1b, c). Restriction fragment length polymorphism analysis demonstrated the persistence of the c.6527insC *COL7A1* pathogenic mutation (Figure S1d). Consistently, type VII collagen expression was absent (Figure S1e).

Proliferation and differentiation

Doubling times of 18 h 27 min and 19 h 30 min were determined for RDEB-E67A6 and RDEB-TA4, respectively (Fig. 1a). Colony-forming efficiency (CFE) assays showed that RDEB-TA4 cells formed large colonies (Fig. 1b). In contrast, RDEB-E67A6 exhibited low number of small and aberrant colonies (Fig. 1b). Seeding

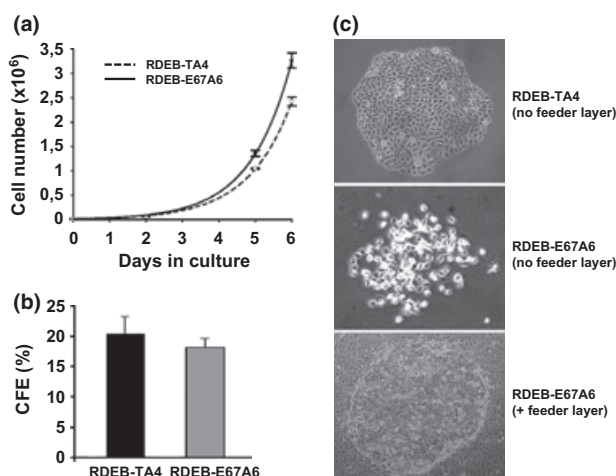


Figure 1. Growth properties of RDEB immortalized cell lines (a) Growth curves of RDEB-E67A6 and RDEB-TA4 cells. The number of cells was determined at 2, 5 and 6 days after seeding 1×10^4 cells. The graph shows curves within the interval of exact exponential cell growth. (b) Quantitative data of CFE. Black bar, RDEB-TA4 cells. Grey bar, RDEB-E67A6 cells. (c) Microscopic appearance of a representative colony from RDEB-TA4 cells (upper panel) in the absence of feeder layer and from RDEB-E67A6 cells with (lower panel) and without (middle panel) feeder layer.

E6E7-immortalized cells with lethally irradiated feeder cells overcame this drawback (Fig. 1b). CFE values were $18.3 \pm 1.5\%$ and $20.4 \pm 2.9\%$ for RDEB-E67 and RDEB-TA4, respectively (Fig. 1c), in the range of highly clonogenic human primary keratinocytes (18). Cell differentiation, assessed *in vitro* after a calcium concentration switch (19), showed that the overall number of keratins K1/K10-positive cells in RDEB immortalized cells and normal keratinocytes was similar (Figure S2).

Cytogenetic changes

Karyotype analysis showed a marked aneuploidy in RDEB-TA4 cells with abundant structural clonal aberrations, including a translocation t(3;10) as one of the most remarkable changes. In contrast, the RDEB-E67A6 karyotype showed only a tetrasomy of chromosome 20 (Figure S3). Amplification of chromosome 20 sequences has been shown in other cells immortalized by E7 protein (20).

Skin regenerative potential and phenotypic features

Immortalized cells were not tumorigenic (data not shown). In short-term subcutaneous grafts (Figure S4a–d), both clones formed well-developed stratified epithelia but exhibited markedly different phenotypes. RDEB-TA4 cells showed aberrant differentiation, mild dysplasia in basal and parabasal layers with anisokaryosis. Dyskeratosis and immature parakeratotic stratum corneum was also observed (Figure S4e). In contrast, RDEB-E67A6 cells gave rise to a well-differentiated epithelium with gradual maturation and formation of well-developed stratum granulosum and stratum corneum with moderate parakeratosis (Figure S4e). Grafts from both cell lines showed dermo-epidermal blister formation, typical of RDEB. Immunofluorescence analysis showed absence of type VII collagen expression at the dermo-epidermal zone (Figure S4f). The quasi-normal behaviour of RDEB-E67A6 in subcutaneous grafts led us to test their performance in orthotopic grafts (21,22) after marking cells with GFP (Fig. 2). It is noteworthy that skin regenerated from RDEB-E67A6 resembled that attained with normal human keratino-

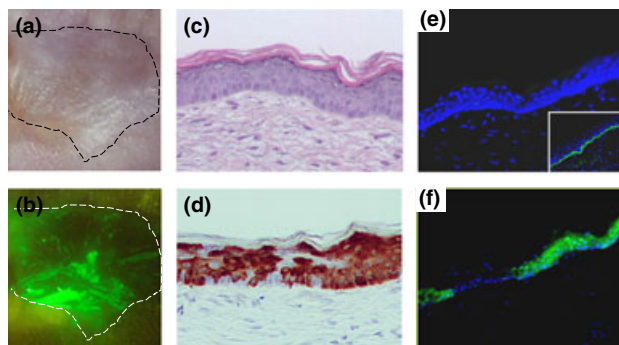


Figure 2. Skin regeneration after orthotopic grafting of bioengineered skins containing immortalized Recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB) cells. (a, b) Macroscopic appearance of regenerated skin 5 weeks after grafting of EGFP-transduced RDEB-E67A6 cells to immunodeficient mice. (a) White light epillumination of a graft (black dotted line). (b) GFP fluorescence of the same graft (white dotted line) shown in (a) (blue light illumination). (c) Histological appearance (H&E staining) of regenerated skin from RDEB-E67A6 graft. (d) GFP immunoperoxidase staining in a graft section consecutive of that shown in (c). (e) Immunofluorescence analysis of collagen VII expression. Note the absence of expression. The inset (lower right corner) shows a collagen VII immunofluorescence from skin regenerated after transplantation of bioengineered skin with normal human keratinocytes as positive control. (f) Immunofluorescence analysis of EGFP expression in a consecutive section of that showed in (e). Note that immunofluorescence analysis of EGFP expression was needed because EGFP fluorescence is lost after tissue fixation in methanol-acetone, the fixative of frozen sections for collagen VII immunofluorescence. (a, b) 6 \times . (c, d) 200 \times . (e, f) 100 \times .

cytes (Fig. 2a–d). Because tissue was dissected carefully to facilitate histological processing, mechanical stress was avoided and blister formation was not evident. However, immunofluorescence again demonstrated lack of type VII collagen expression (Fig. 2e).

Conclusions

Immortalized cells capable to reproduce disease phenotypes represent valuable tools to replace primary cells limited by senescence-imposed constraints. Despite variations in the immortalization procedures used, no significant differences were observed in terms of proliferation when cells were seeded at medium or high density. Under extreme isolation, however, RDEB-E67A6 cells had more complex growth factor and/or nichelike requirements. Immortalized RDEB cell lines resisted high calcium-induced growth arrest (23) without losing their differentiation abilities and consistently with

their capacity to achieve epidermal stratification *in vivo*. However, although proficient for skin regeneration, T antigen-immortalized cells displayed a more aberrant epidermal differentiation than E6E7-immortalized ones. In view of the stringent growth requirements for clonal growth and nearly normal skin regenerative features, transduction of E6E7 proteins seems to drive RDEB cells to a less defiant immortalization state than that driven by the large T antigen.

Gross aneuploidy and chromosomal structural abnormalities were observed in T antigen-immortalized cells. Conversely, E6E7 immortalization rendered diploid or near diploid cells. Others have also shown that the T antigen produced a large number of chromosomal aberrations (24–27) perhaps unrelated to its ability to extend cellular lifespan but rather to interact with the spindle checkpoint machinery (28). Other less genotoxic forms to extend cells lifespan, including forced expression of telomerase, exist (29). However, keratinocytes require additional genetic changes to overcome senescence (30). While the most conceivable rationale for the differential cell behaviour relies on the degree of genetic instability produced by the different immortalization molecules, we cannot rule out intrinsic genetic or epigenetic background differences of the patients notwithstanding the presence of the same pathogenic *COL7A1* mutation.

The new immortalized cell lines herein described represent reliable cellular systems to test novel therapeutic approaches for RDEB.

Acknowledgements

FL was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III (PI11/01225) and Comunidad de Madrid (S2010/BMD- 2359; SKINMODEL). MDR was supported by grants from the Science and Innovation Ministry of Spain (SAF2010-16976) and Comunidad de Madrid (S2010/BMD-2420; CELL-CAM). MG is supported in part by ERA-NET grant: E-Rare-2 (SpliceEB).

Author contribution

FL, MDR designed the study. CC, DA, BD, RM, ÁM, MG and MJE performed the experimental work. SGL, ÁM established primary keratinocyte cultures from patient skin biopsies. JCC and LE performed the cytogenetic analysis. CJC performed the histopathological analysis. RG and RM provided materials. FL, RM, MDR wrote and reviewed the manuscript.

Conflict of interests

All authors declare no conflict of interests.

References

- Knaup J, Verwanger T, Gruber C *et al.* *Exp Dermatol* 2012; **21**: 526–530.
- van den Akker P C, Jonkman M F, Rengaw T *et al.* *Hum Mutat* 2011; **32**: 1100–1107.
- Escamez M J, Garcia M, Cuadrado-Corrales N *et al.* *Br J Dermatol* 2010; **163**: 155–161.
- Cuadrado-Corrales N, Sanchez-Jimeno C, Garcia M *et al.* *BMC Med Genet* 2010; **11**: 139.
- Uitto J. *J Invest Dermatol* 2012; **132**: E29–E34.
- Chamcheu J C, Wood G S, Siddiqui I A *et al.* *Exp Dermatol* 2012; **21**: 481–489.
- Mavilio F, Pellegrini G, Ferrari S *et al.* *Nat Med* 2006; **12**: 1397–1402.
- Naldini L. *Nat Rev* 2011; **12**: 301–315.
- Larcher F, Dellambra E, Rico L *et al.* *Mol Ther* 2007; **15**: 1670–1676.
- Mathor M B, Ferrari G, Dellambra E *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**: 10371–10376.
- Titeux M, Pendaries V, Zanta-Boussif M A *et al.* *Mol Ther* 2010; **18**: 1509–1518.
- Chen M, Kasahara N, Keene D R *et al.* *Nat Genet* 2002; **32**: 670–675.
- Morley S M, D'Alessandro M, Sexton C *et al.* *Br J Dermatol* 2003; **149**: 46–58.
- Chamcheu J C, Lorie E P, Akgul B *et al.* *J Dermatol Sci* 2009; **53**: 198–206.
- Mecklenbeck S, Compton S H, Mejia J E *et al.* *Hum Gene Ther* 2002; **13**: 1655–1662.
- Chipev C C, Steinert P M, Woodworth C D. *J Invest Dermatol* 1996; **106**: 385–390.
- Hawley-Nelson P, Voudsen K H, Hubbert N L *et al.* *EMBO J* 1989; **8**: 3905–3910.
- Barbaro V, Testa A, Di Iorio E *et al.* *J Cell Biol* 2007; **177**: 1037–1049.
- Hennings H, Michael D, Cheng C *et al.* *Cell* 1980; **19**: 245–254.
- Cuthill S, Agarwal P, Sarkar S *et al.* *Genes Chromosom Cancer* 1999; **26**: 304–311.
- Del Rio M, Larcher F, Serrano F *et al.* *Hum Gene Ther* 2002; **13**: 959–968.
- Llames S G, Del Rio M, Larcher F *et al.* *Transplantation* 2004; **77**: 350–355.
- Pei X F, Sherman L, Sun Y H *et al.* *Carcinogenesis* 1998; **19**: 1481–1486.
- Sack G H Jr, Obie C. *Exp Cell Res* 1981; **134**: 425–432.
- Kulkarni Schmidt-Kastner P S, Heiden T, Tribukait B *et al.* *Anticancer Res* 1996; **16**: 2681–2686.
- Miquel C, Gagnoux-Palacios L, Durand-Clement M *et al.* *Exp Cell Res* 1996; **224**: 279–290.
- Stewart N, Bacchetti S. *Virology* 1991; **180**: 49–57.
- Cotsiki M, Lock R L, Cheng Y *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**: 947–952.
- Lee K M, Choi K H, Ouellette M M. *Cytotechnology* 2004; **45**: 33–38.
- Kiyono T, Foster S A, Koop J I *et al.* *Nature* 1998; **396**: 84–88.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. Phenotypic and genotypic features of immortalized RDEB cell lines.

Figure S2. Calcium induced differentiation of immortalized RDEB cells.

Figure S3. Cytogenetic abnormalities of immortalized RDEB cells.

Figure S4. Subcutaneous bioengineered skin xenotransplantation procedure and characterization of skin regeneration from grafted immortalized RDEB cells.

Appendix S1. Materials and methods.

Gene Editing for the Efficient Correction of a Recurrent *COL7A1* Mutation in Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa Keratinocytes

Cristina Chamorro^{1,2}, Angeles Mencía^{2,3}, David Almarza^{1,4}, Blanca Duarte^{1,2,5}, Hildegard Büning^{6,7}, Jessica Sallach⁶, Ingrid Hausser⁸, Marcela Del Río^{2,3,5}, Fernando Larcher^{1,2,3,5} and Rodolfo Murillas^{1,2,5}

Clonal gene therapy protocols based on the precise manipulation of epidermal stem cells require highly efficient gene-editing molecular tools. We have combined adeno-associated virus (AAV)-mediated delivery of donor template DNA with transcription activator-like nucleases (TALE) expressed by adenoviral vectors to address the correction of the c.6527insC mutation in the *COL7A1* gene, causing recessive dystrophic epidermolysis bullosa in a high percentage of Spanish patients. After transduction with these viral vectors, high frequencies of homology-directed repair were found in clones of keratinocytes derived from a recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB) patient homozygous for the c.6527insC mutation. Gene-edited clones recovered the expression of the *COL7A1* transcript and collagen VII protein at physiological levels. In addition, treatment of patient keratinocytes with TALE nucleases in the absence of a donor template DNA resulted in nonhomologous end joining (NHEJ)-mediated indel generation in the vicinity of the c.6527insC mutation site in a large proportion of keratinocyte clones. A subset of these indels restored the reading frame of *COL7A1* and resulted in abundant, supraphysiological expression levels of mutant or truncated collagen VII protein. Keratinocyte clones corrected both by homology-directed repair (HDR) or NHEJ were used to regenerate skin displaying collagen VII in the dermo-epidermal junction.

Molecular Therapy—Nucleic Acids (2016) 5, e307; doi:10.1038/mtna.2016.19; published online 5 April 2016

Subject Category: Gene Insertion, Deletion & Modification

Introduction

Precise modification of the genome of cultured human cells to revert disease-causing mutations has been facilitated by recent advances in molecular tools, and specifically by the development of customized programmable genomic nucleases¹ and highly efficient gene and cell targeting protocols based on recombinant adeno-associated (rAAV) vectors.^{2,3} Customizable nucleases include zinc-finger nucleases, transcription activator-like nucleases (TALENs), and clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) nucleases. All of them are designed to bind specific DNA sequences and create site-specific double-strand DNA breaks (DSBs). These are repaired mostly by the nonhomologous end joining DNA repair pathway (NHEJ), which is prone to introducing small insertions and deletions (indels) at the DSB sites. However, in the presence of donor DNA molecules homology-directed repair (HDR) may occur by engaging the cellular homologous recombination DNA repair pathway, albeit at low frequency. *Ex-vivo* preclinical^{4,5} and clinical⁶ protocols based on TALEN and Zinc-finger nucleases show the therapeutic potential of gene editing. Adeno-associated virus (AAV) vectors are a fundamental tool in current gene

replacement-based gene therapy protocols, and have also shown great promise in many preclinical and clinical trial settings.⁷ In addition, AAV vectors can deliver gene-targeting constructs as single-stranded linear DNA molecules that serve as donor templates for homologous recombination, allowing high targeting frequencies² and have the capability to deliver DNA efficiently and without significant toxicity into hard to transduce primary cell cultures, overcoming a critical hurdle for *ex vivo* gene therapy in patient cells.^{3,8–10} The use of target-specific nucleases to generate DSBs in the target locus greatly increases AAV vector-mediated gene-targeting frequencies.^{11–13}

Recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB) is a hereditary skin disease caused by loss of function mutations in *COL7A1*, a gene expressed by skin keratinocytes and fibroblasts that encodes the pro- α 1 (VII) chain of type VII collagen (C7). Three alpha chains fold into a triple helical conformation to give rise to the procollagen molecules which after being secreted undergo additional processing and arrange into type VII collagen fibers, the main component of the anchoring fibrils that connect the epidermal basement membrane to the dermal tissue. C7 deficiency causes loss of dermo-epidermal adhesion resulting in blister formation and

The first two authors contributed equally to this work.

¹Epithelial Biomedicine Division, Centro de Investigaciones Energéticas Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), Madrid, Spain; ²Instituto de Investigación Sanitaria de la Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain; ³Department of Biomedical Engineering, Carlos III University (UC3M), Madrid, Spain; ⁴Present address: Institute of Cellular Medicine, University of Newcastle, Newcastle Upon Tyne, UK; ⁵Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER) U714, Madrid, Spain; ⁶Center for Molecular Medicine Cologne (CMC), University of Cologne, Köln, Germany; ⁷Institute of Experimental Hematology, Hannover Medical School, Hannover, Germany; ⁸Institute of Pathology, Universitätsklinikum Heidelberg, Heidelberg, Germany. Correspondence: Rodolfo Murillas, Epithelial Biomedicine Division, Cutaneous Disease Modelling Unit, CIEMAT-CIBERER (Centre for Biomedical Research on Rare Diseases) U714, Avenida Complutense 40, Madrid 28040, Spain. E-mail: rodolfo.murillas@ciemat.es Or Fernando Larcher, Epithelial Biomedicine Division, Cutaneous Disease Modelling Unit, CIEMAT-CIBERER (Centre for Biomedical Research on Rare Diseases) U714, Avenida Complutense 40, Madrid 28040, Spain. E-mail: fernando.larcher@ciemat.es

Keywords: AAV vectors; epidermolysis bullosa; gene editing; indels, homologous recombination; TALEN

Received 4 February 2016; accepted 13 February 2016; published online 5 April 2016. doi:10.1038/mtna.2016.19

scarring.¹⁴ We have recently described a recurrent frame-shift mutation (c.6527insC) in the exon 80 of *COL7A1* gene that produces a premature termination codon (PTC). The high prevalence of this mutation (46% of RDEB alleles in Spanish patients)¹⁵ justifies the development of targeted therapies. Although HDR allows the most precise genetic correction, that is, the restoration of the complete coding sequence of the mutated gene, strategies based on NHEJ-mediated indel generation can be conceived. The generation of indels in the vicinity of the pathogenic mutation can lead to restoration of the reading frame, although usually involving limited changes in the aminoacid sequence. When the introduction of indels results in alteration or elimination of intron splice sites, exon skipping can produce a transcript encoding a truncated form of the protein. The feasibility of frame restoration by indel generation with nucleases has previously been demonstrated in cells from Duchenne muscular dystrophy patients, achieving reading frame restoration of the dystrophin transcript and dystrophin protein expression by introducing indels with TALENs¹⁶ and exon skipping of a PTC-containing exon by using zinc-finger nucleases.¹⁷ The *COL7A1* gene is also suitable for exon-skipping approaches, since all exons in the *COL7A1* triple helix-coding region are very short, encode Gly-X-Y aminoacid repeats beginning with intact codons for the glycine residues and are arranged in frame.¹⁸ Since NHEJ-mediated repair occurs much more frequently than HDR, gene editing by designer nucleases-generated indels should be much easier to implement than HDR-based gene targeting, which usually requires the introduction of antibiotic resistance cassettes to select for homologous recombination events.

Here, we address the *ex-vivo* correction of the highly recurrent c.6527insC mutation using gene-editing approaches based on site-specific nucleases and gene-targeting constructs delivered by nonintegrating viral vectors.

Results

Generation of pairs of TALE nucleases designed to cut in the proximity of the c.6527insC mutation

Pairs of TALENs were designed with TALEffector-Nucleotide Targeter design Software¹⁹ and constructed using the Golden Gate method.²⁰ A total of 17 TALENs were constructed (Supplementary Figure S1a). Since carboxy terminal deletions of TALEN nucleases have significantly increased nuclease activity,²¹ we constructed TALEN proteins retaining 30 aminoacids of the carboxy terminal region, and included a sequence encoding a nine aminoacids HA tag between the TALE binding and FokI nuclease domains (+30+HA design) to allow immunodetection with anti HA antibodies. The N-terminal domain was left intact. Expression in these constructs is driven by the phosphoglycerate kinase (PGK) promoter. We also constructed TALENs with the same DNA binding repeats but based on a design retaining 63 aminoacids at the carboxy terminus and having a 152 aminoacids N-terminal deletion, using the pCAG-T7-TALEN as destination vector (+63 design) (Supplementary Figure S1b).

TALEN constructs with the +30+HA design were individually transfected in 293T cells to analyze their correct expression by western blot using anti HA antibodies (Supplementary

Figure S2a). For functionality assays, pairs of TALENs were transfected into 293T cells and tested for their ability to generate indels at the nuclease target region by performing the Cel I/ Surveyor nuclease assay.²² All TALEN pairs tested with this protocol showed functionality to some extent, and comparable results were found for our +30+HA design and the +63 design (Supplementary Figure S2b). The +30+HA design was used in subsequent experimentation *since it allowed efficient immunodetection of TALEN proteins*.

TALENs delivery to patient keratinocytes by adenoviral vectors

To equip keratinocytes with TALENs, we decided for viral vector-mediated gene delivery. Specifically, we constructed bicistronic adenoviral vectors for coexpression of TALENs and a marker gene (GFP) under the control of the PGK promoter (Ad-TALENs). Of the candidates shown to be active in the transient transfection assay in 293T cells, three pairs of TALENs were chosen (Figure 1a).

The ability of Ad-TALENs to transduce human keratinocytes was assessed in patient-derived RDEB-E67A6 immortalized keratinocytes, carrying the highly recurrent

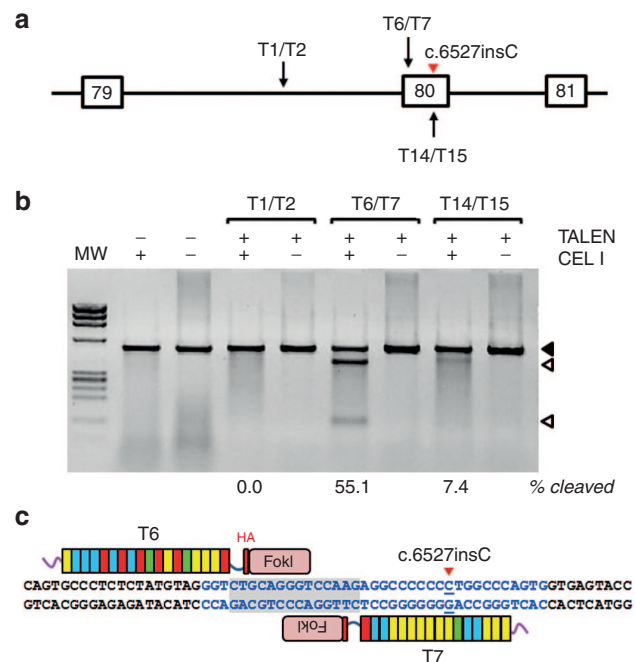


Figure 1 Design and activity of transcription activator-like nucleases (TALENs) targeted to exon 80 and intron 79. Three pairs of TALENs with targets across intron 79 and exon 80 (a) were expressed with adenoviral vectors in RDEB-E67A6 keratinocytes. A polymerase chain reaction (PCR) product spanning the TALEN target sites was generated with primers F1/R and analyzed with the Cel I (Surveyor) mutation detection assay, showing efficient indel generation activity for the T6/T7 pair, only weak activity for T14/T15 and no detectable activity for T1/T2. Solid arrowhead indicates uncleaved DNA, arrowheads indicate cleavage fragments. Percentage of cleavage for each PCR product is shown at the bottom. IX molecular weight marker (MW) (b). Schematic drawing showing the position of T6 and T7 TALENs on a genomic DNA sequence fragment containing *COL7A1* exon 80 (blue) and the c.6527insC mutation site (red arrowhead). TALENs spacer sequence is shaded (c). RDEB, recessive dystrophic epidermolysis bullosa.

c.6527insC mutation in both alleles of the *COL7A1* gene.²³ Infection with a multiplicity of infection (MOI) of 1,000 vector genomes (vg)/cell resulted in strong and generalized GFP expression for all six vectors. Expression of TALEN proteins was analyzed by western blot (Supplementary Figure S3a) and immunofluorescence (Supplementary Figure S3b) with anti-HA tag antibodies, showing highly efficient expression at comparable levels for all TALEN proteins.

Indel generation was assessed for each TALEN pair by using the Cel I mutation detection assay in RDEB-E67A6 keratinocytes transduced with the three pairs of Ad-TALENs vectors at a MOI of 1,000 vg/cell for each construct. Efficient indel generation activity was found for the T6/T7 pair, while only weak activity was detected for T14/T15 and no

detectable activity could be found for T1/T2 (Figure 1b). The T6/T7 pair was therefore chosen for subsequent gene-editing experiments (Figure 1c).

c.6527insC mutation correction by HDR

To address the correction of the c.6527insC mutation in exon 80 of *COL7A1* gene by homologous recombination, we constructed AAV vector-based targeting constructs. The vector genomes contained genomic DNA sequences homologous to the *COL7A1* target region, including a wild-type exon 80 (having a run of six cytosines versus seven cytosines in the c.6527insC allele) in the right donor arm, and neomycin resistance (neo)-expressing cassettes flanked by AAV-packaging signals (Figure 2a). We used two different strategies for

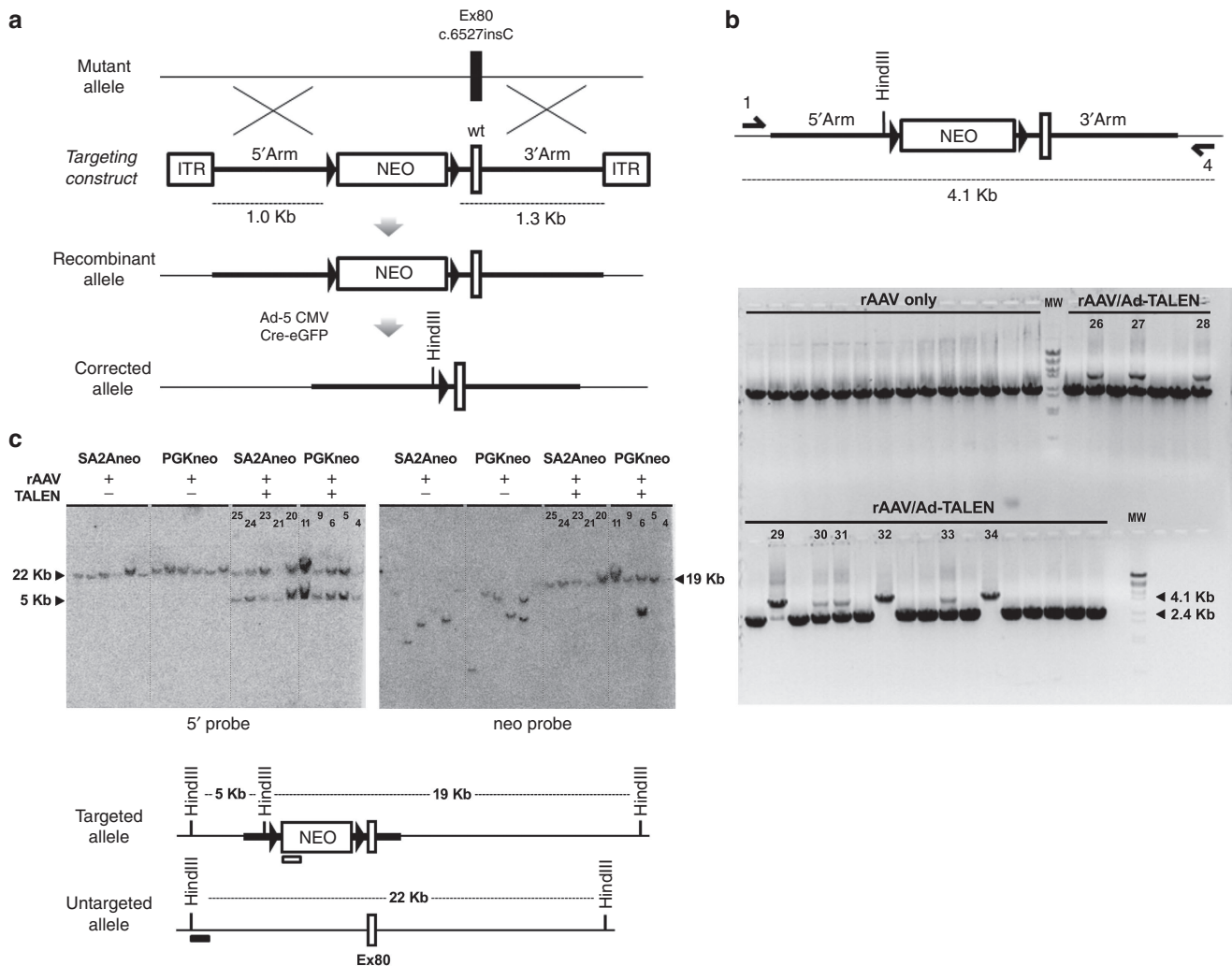


Figure 2 Gene targeting by homologous recombination strategy and genotyping of G418-resistant RDEB-E67A6 clones. AAV vector-delivered targeting constructs consist of left (1.0 kb) and right (1.3 kb) homology arms flanking a floxed neo selection cassette. The right arm contains the wild type sequence for exon 80. Ad-Cre transduction allows selection cassette removal to generate the corrected allele (a). Homologous recombination was analyzed by polymerase chain reaction using primer pair 1 and 4 external to the targeting construct that amplify a 2.4 kb in the untargeted allele and 4.1/4.2 kb (for SA-2A-neo /PGK-neo cassettes) in the targeted allele. AAV-SA-2A-neo-targeted clones are shown (b). Southern blot analysis. Genomic DNA from recombinant clones digested with Hind III, single cutter in the donor cassette, hybridized to a neo probe (right panel) showed a single band of the expected size (19 kb), indicating integration of a single copy of the targeting vector, in all but one of the recombinant clones. In nonrecombinant controls, a single band with different mobility for every clone suggests random integrations of a single copy of the targeting vector in all but one clone. A 5' external probe (left panel) showed bands corresponding to the wild-type (WT) (22 kb) and recombinant (5 kb) alleles in recombinant clones and just the WT band in control clones (c). RDEB, recessive dystrophic epidermolysis bullosa.

neo expression, a PGK-neo cassette for constitutive expression of neo driven by the PGK promoter, and a gene trap cassette (SA-2A-neo) in which a promoterless neo sequence is fused to a ribosomal-skipping 2A peptide sequence and is preceded by a splice acceptor (SA) sequence. This gene-trap strategy should result in neo expression only upon integration of the targeting construct into an intron of an expressed gene, and would therefore result in selection of fewer off-target integration events. Selection cassettes were flanked by loxP sites to allow for Cre recombinase-mediated cassette removal after recombination. These constructs were designated as AAV-PGK-neo and AAV-SA-2A-neo (**Supplementary Figure S4**). These vector genome constructs were packaged into the recently developed AAV2-derived engineered capsid variants with high keratinocyte transduction ability designated as AAV-Kera1 and AAV-Kera2. These are AAV2 peptide insertion variants displaying different 7-mer peptides at capsid position 587.³ We tested AAV preparations with both capsid variants to assess the possibility that they might yield different rates of recombination.

We cotransduced RDEB-E67A6 cells with AAV vectors carrying the targeting constructs and adenoviral vectors expressing the T6/T7 TALEN pair. After treating the cells with G418, resistant clones were isolated and genotyped by PCR to detect homologous recombination using primers complementary to the genomic sequence flanking the targeting construct. Specifically, a DNA fragment of 2.4 kb will be amplified from the untargeted allele, while a fragment of 4.1/4.2 kb (depending on which neo cassette was used) indicates the targeted allele (primers 1 and 4) (**Figure 2b**). The presence of the recombinant allele was further verified by polymerase chain reaction (PCR) using primer pair 1 and 2 (specific for PGK-neo cassette) or 1 and 2B (specific for SA-2A-neo cassette), amplifying through the left arm of the construct, and primer pair 3 and 4, amplifying through the right arm (**Supplementary Figure S5**).

We performed five independent targeting experiments, using PGK-neo and SA-2A-neo AAV vectors. Results for each experiment are shown in **Table 1**. In total, targeting efficiency was 11% (19 of 166 clones) for the PGK-neo AAV vectors and 39% (15 of 38) for the SA-2A-neo vectors, as assessed by PCR genotyping of G-418 resistant clones. AAV vectors with capsid variants Kera1 and Kera2 yielded

comparable recombination efficiencies (**Table 1**). Four biallelically targeted clones (4 of 15) were obtained when using the gene trap design, while only monoallelic correction was achieved with the PGK-neo constitutive expression design. Thus, the use of the more stringent, gene trap-based selection strategy resulted in a more than threefold increase in targeting efficiency over the constitutive neo expression strategy. The presence of the *COL7A1*/2A-neo fusion transcript in recombinant clones obtained by transduction with the SA-2A-neo-AAV vector was verified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) using primers specific to exon 73 of *COL7A1* and to the neo resistance sequence. Sequencing of the RT-PCR product showed an in-frame fusion transcript comprised of *COL7A1*, 2A and neo sequences (**Supplementary Figure S6**). The correction of the c.6527insC mutation in exon 80 was verified by PCR amplification of the targeted allele using primer pair 3 (in the neo selection cassette) and 4 (in genomic sequence external to the targeting construct) (**Supplementary Figure S5**) and sequencing the PCR product. Thirty-two of 34 (94%) recombinant clones carried the corrected allele. To unambiguously analyze the mutation status of the targeted clones, we also performed PCR with primers Col7KI-B2-F (in the genomic sequence at the base of the right homology arm) and 4, amplifying a fragment spanning the exon 80 both in targeted and untargeted alleles (**Supplementary Figure S7**). For every targeting experiment, a control with AAV targeting vector only (without Ad-TALENs) was done. PCR genotyping showed that out of a total of 98 G418-resistant control clones (65 for the PGKneo vectors and 33 for the gene trap vectors) none of them had undergone homologous recombination (**Figure 2b**).

A subset of 10 recombinant and 12 control clones were further analyzed by Southern blot with a neo probe to assess whether multiple targeting vector integrations had taken place. An external 5' probe produced two bands corresponding to the wild type (22 kb) and targeted allele (5 kb) for all the recombinant clones analyzed, and a single wild type allele band for controls, confirming PCR genotyping results (**Figure 2c**, left panel). All but one of the targeted clones analyzed with the neo probe (9 of 10) showed a single band of the expected size (19 kb), indicating integration of a single copy of the targeting vector. One clone showed two

Table 1 Efficiency of c.6527insC correction by homologous recombination

Targeting construct	AAV capsid	TALENs T6-T7	Clones analyzed	Recombinant clones	Corrected clones	Homozygous insertion
PGK-neo	H1	(+)	53	6	5	0
		(-)	20	0	-	0
	H3	(+)	30	4	4	0
		(-)	83	9	9	0
SA-2A-neo	H1	(+)	45	0	-	0
		(-)	14	6	6	1
	H3	(+)	19	0	-	0
		(-)	24	9	8	3
		(+)	14	0	-	0
		(-)				

RDEB-E67A6 keratinocytes were transduced with rAAV gene targeting vectors containing a PGK-neo or SA-2A-neo selection cassettes. Vectors packaged with two different recombinant capsids, H1 or H3, were tested, with or without TALENs-expressing adenoviral vectors Ad-T6 and Ad-T7. Targeting efficiencies are shown for each experiment.

bands, indicating an additional integration. Eleven out of 12 non-recombinant control clones (transduced with targeting vector in the absence of TALENs) probed with neo showed a single band with different mobility for every clone, suggesting random integration in different genomic locations of a single copy of the targeting vector. Only one clone showed two bands, indicating two integrations (Figure 2c, right panel).

To avoid silencing of *COL7A1* gene expression by the neo selection cassette inserted in intron 79, as had been shown in a hypomorphic mouse model,²⁴ the cassette was removed by infection of recombinant clones with a Cre-expressing adenoviral vector (Ad-Cre). Twenty correctly targeted clones were infected and removal of the cassette was analyzed by PCR amplification using primers external to the targeting construct that detect different mobility bands for the selection cassette-containing allele (4 kb) and untargeted or corrected

allele (2.4 kb). Disappearance of the 4 kb band indicated efficient cassette elimination in every clone. Hind III digestion of the PCR product allowed to discriminate the recombinant corrected vs the untargeted allele after Cre expression (Supplementary Figure S8).

RT-PCR expression analysis showed that *COL7A1* was expressed in 19 different recombinant clones that had the corrected sequence (6Cs) at the c.6527insC mutation site, before and after Cre expression. Keratinocytes from a healthy donor (WT HK) and from a c.6527insC heterozygous donor (HT HK), as well as RDEB-E67A6 parental cells, were used as controls. All corrected clones expressed *COL7A1* at levels higher than unedited RDEB-E67A6 parental cells (Figure 3a). An uncorrected control clone (clone 17), targeted by homologous recombination but maintaining the c.6527insC mutation, displayed *COL7A1* expression levels

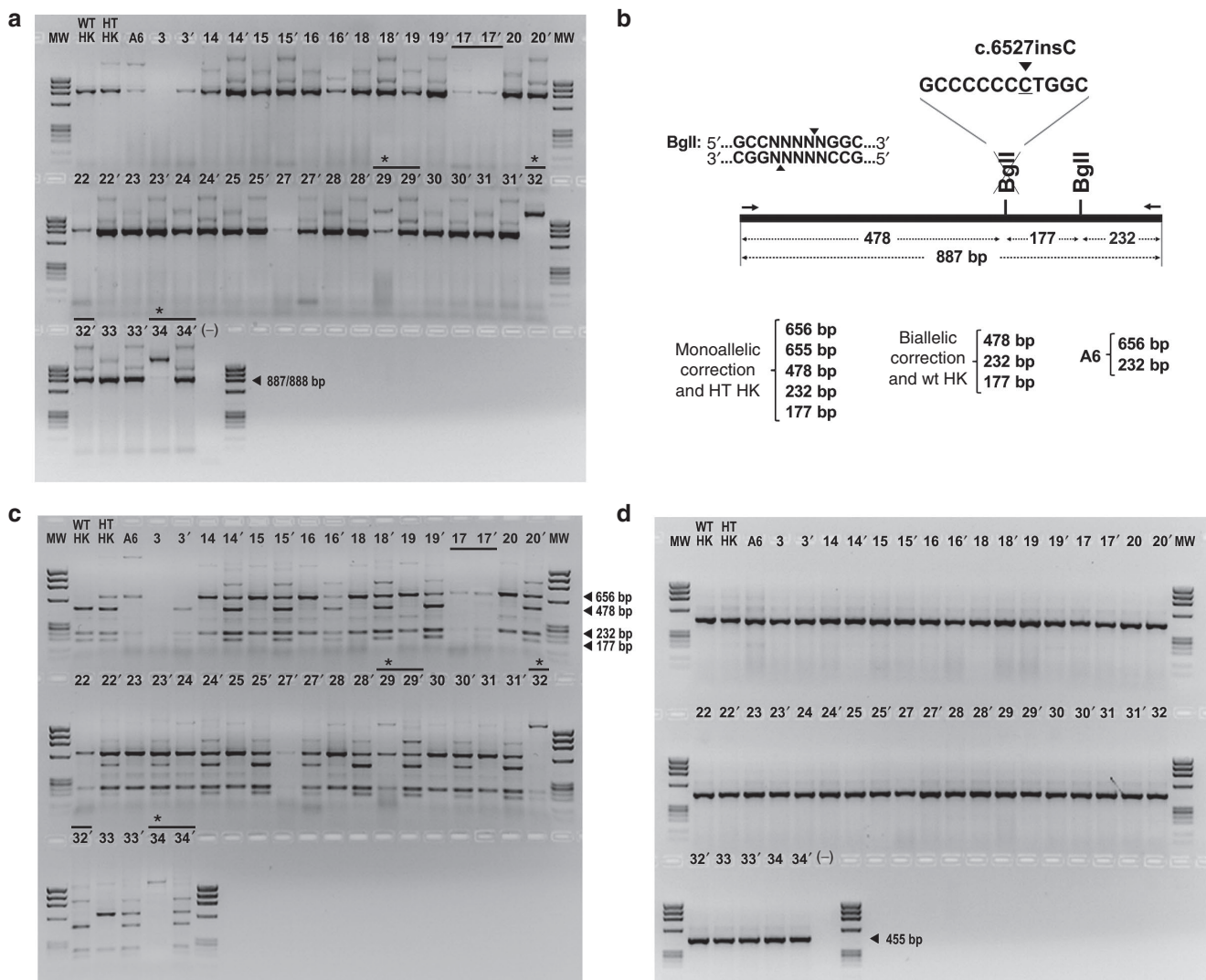


Figure 3 Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of *COL7A1* expression in homology-directed repair-corrected RDEB-E67A6 keratinocyte clones. Nineteen recombinant clones that had the corrected sequence (6Cs) at the c.6527insC mutation site were analyzed before and after transduction with Ad-Cre. Clone numbers are indicated above the lanes before (n) and after (n') transduction with Ad-Cre. Clone 17 (uncorrected control) is underlined. Biallelically targeted clones (29, 32, 34) are labeled with asterisks. Normal human keratinocytes from an unaffected donor (HK) and a heterozygous carrier of the c.6527insC allele (HT) were used as controls of *COL7A1* physiological expression levels. (a). Bgl I restriction patterns of RT-PCR bands corresponding to transcripts from WT (corrected) and c.6527insC alleles (b) allow to compare transcription from each allele (c). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression was analyzed as a loading control (d). RDEB, recessive dystrophic epidermolysis bullosa.

comparable to RDEB-E67A6 cells, before or after Cre-mediated deletion of the selection cassette (**Figure 3a**, underlined lanes). Sequencing of the PCR products showed that, prior to cassette removal, only the uncorrected allele (containing the c.6527insC mutation, 7Cs at the mutation site) was expressed, while after cassette removal both the corrected (6Cs at the mutation site) and uncorrected alleles (7Cs) were expressed. In clones targeted at both *COL7A1* alleles with the gene trap vector (clones 29, 32, and 34) (**Figure 3a**, labeled with asterisks) a band of the expected size was found after Ad-Cre transduction (same as in clones having a single corrected allele). However, the RT-PCR band for these biallelically targeted clones prior to Cre expression was of higher molecular weight than expected for *COL7A1* cDNA amplification. Sequencing revealed that this band corresponded to a fusion between the neo resistance cassette sequence and *COL7A1* sequence. Clone 29 displayed both the *COL7A1* band and the fusion band before Ad-Cre, probably because it is a mixed population.

Transcription from the wt (6Cs) and c.6527insC (7Cs) alleles can be differentiated by digestion of RT-PCR products with BglI restriction enzyme, since the c.6527 mutation abolishes this site (**Figure 3b**). BglI restriction patterns confirmed that, prior to cassette removal, the RT-PCR band represented transcription from the c.6527 mutant allele only in all monoallelically targeted and corrected clones, and after Cre expression comparable amounts of corrected and uncorrected alleles were expressed in these clones (**Figure 3c**). The restriction pattern for the band from clone 17 (homologous recombinant without correction of the c.6527insC mutation) was consistent with expression of the uncorrected allele before and after Ad-Cre. To further quantify the expression of the corrected and uncorrected alleles before and after Cre-mediated deletion of the selection cassette, we performed T-A cloning in pGEM-T plasmid vector and sequencing of the RT-PCR products for clones PGKneo-HDR 18 (one allele targeted with the AAV-PGKneo vector), gene trap HDR-33 (one allele targeted with the AAV-SA-2A-neo gene trap vector) and gene trap HDR-32 (both alleles targeted with the AAV-SA-2A-neo gene trap vector). Approximately 10 colonies were analyzed for each clone. Before Cre expression, only transcripts corresponding to the untargeted allele were found for the PGKneo vector-targeted clone 18. Transcripts corresponding to the untargeted allele and fusion transcripts between neo and *COL7A1* were found in clone 33, monoallelically targeted with the gene trap vector and only fusion transcripts were found in clone 32, biallelically targeted with the gene trap vector. After excision of the neo cassette, monoallelically targeted clones 18 and 33 expressed both the untargeted (7Cs) and corrected (6Cs) alleles at similar ratios, while biallelically targeted clone 32 expressed only the corrected allele (**Supplementary Figure S9**).

COL7A1 frame restoration by NHEJ: isolation of keratinocyte clones with indels in COL7A1 exon 80

To obtain keratinocyte clones carrying insertions and deletions (indels) in the exon 80 of *COL7A1* gene produced by NHEJ-mediated repair of DSBs, we transduced RDEB-E67A6 cells with adenoviral vectors for expression of T6 and T7 TALENs (MOI 1,000 vg/cell) and obtained clones by limiting

dilution. The presence of indels was analyzed for each clone by sequencing a PCR fragment spanning the nuclease target site. When overlapping chromatogram traces were found (**Supplementary Figure S10**) the sequence of both alleles was sorted out for each clone by using the Poly peak parser software.²⁵ Out of 113 clones analyzed, 30 (26.5 %) contained indels in this region. Although a total of nineteen different indel alleles were found, some of them occurred with higher frequency. Eleven clones had a 1 bp deletion, four clones presented an 18bp deletion and two had a 19bp deletion. These recurrent mutations were found as heterozygous as well as homozygous and compound heterozygous mutant alleles (**Figure 4**).

COL7A1 gene expression was analyzed by RT-PCR in one clone for each mutation or combination of mutations. Remarkably, high *COL7A1* transcript expression levels were found by RT-PCR in most indel-carrying clones, both in clones with frame-shifting indels causing frame restoration and in clones with indels not leading to frame recovery, compared to the RDEB-E67A6 parental cell line (**Figure 5a**). Human keratinocytes from an unaffected donor (WT) and a heterozygous carrier of the c.6527insC allele were used as controls of *COL7A1* physiological expression levels. RT-PCR products were sequenced to analyze transcript sequences, revealing overlapping chromatogram traces corresponding to edited and unedited alleles for the indel region in clones with one edited allele, and to differently edited alleles in clones with edition of both alleles. To sort out both alleles and quantify their relative expression, we performed T-A cloning and sequencing of the RT-PCR products. This analysis showed that both the re-framed and the unedited alleles were expressed at a similar ratio, regardless of whether frame restoration was caused by intra-exonic or exon skipping indel mutations (**Supplementary Figure S11**). Intra-exonic deletions $\Delta 1$, $\Delta 7$, $\Delta 16$, and $\Delta 19$, compatible with frame shifting-mediated recovery of *COL7A1* expression, resulted in transcripts encoding limited changes in aminoacid sequence in the exon 80 region. The most common indel ($\Delta 1$) resulted in four aminoacids changed within the exon 80-encoded sequence. Transcripts from clones lacking intron processing signal at the 5' ($\Delta 20$, $\Delta 34$, $\Delta 43$) or 3' ($\Delta 40$, $\Delta 42$) sequence of exon 80 skipped this exon altogether, resulting in a truncated collagen transcript lacking the sequence corresponding to the 12 aminoacids encoded by exon 80. Out of frame transcript sequences were found in RT-PCR products from clones with intra-exonic deletions that did not restore the reading frame ($\Delta 6$ ins3, $\Delta 6$, $\Delta 8$, $\Delta 2$ and $\Delta 5$, **Figure 4**). However, a clone with an 18bp biallelic deletion within the exon 80 sequence ($\Delta 18$, **Figure 4**) yielded in-frame transcripts skipping exon 80 and exons 80–81 (**Figure 5b**). In total, 22 of the 113 clones analyzed (19.5%) presented indels that result in expression of transcripts encoding mutated or truncated C7.

C7 protein expression in NHEJ-corrected and HDR-corrected clones

We analyzed C7 expression by western blot in clones corrected by HDR, before and after Ad-Cre-mediated removal of the selection cassette, and NHEJ. For HDR-corrected clones we analyzed protein extracts from five clones: 4, 6, and 51, corrected with the PGK-neo vector, and 32 (bi-allelic correction) and 33, corrected with the SA-2Aneo gene trap vector. We found that,

	WT	Exon 80	Het	Hom
	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGGGTCTGCAGGGTCCAAGAGGCCCCCTGGCCCAAGTGGT			
Δ1	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGGGTCTGCAGG-TCCAAGAGGCCCCCTGGCCCAAGTGGT		8	1
Δ1,+1	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGGGTCTGCAAGGTCCAAGAGGCCCCCTGGCCCAAGTGGT		1	0
Δ2	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGGGTCTGCAGGGT--AAGAGGCCCCCTGGCCCAAGTGGT		1	0
Δ2	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGGGTCTGCAG--TCCAAGAGGCCCCCTGGCCCAAGTGGT		1	0
Δ6,+3	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGGGTCTGCG--GGG--CAAGAGGCCCCCTGGCCCAAGTGGT		1	0
Δ5	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGGGTCTGCAG----AAGAGGCCCCCTGGCCCAAGTGGT		1	0
Δ5	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGGGTCTGCA----CAAGAGGCCCCCTGGCCCAAGTGGT		1	0
Δ6	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGGGTCTGCG----CAAGAGGCCCCCTGGCCCAAGTGGT		0	1
Δ6	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGGGTCTGCA----AAGAGGCCCCCTGGCCCAAGTGGT		0	1
Δ7	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGGGTCTGCA----AGAGGCCCCCTGGCCCAAGTGGT		1	0
Δ8	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGGGTCTGCAG----AGGCCCCCTGGCCCAAGTGGT		1	0
Δ18	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGGG-----CCCCCCTGGCCCAAGTGGT		3	1
Δ19	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGG-----CCCCCCTGGCCCAAGTGGT		1	0
Δ34	...GATTGAGGCTCATCAGTGCC-----CCCCCTGGCCCAAGTGGT		1	0
Δ40	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGGGTCTGCA-----AG--		1	0
Δ42	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAG-----TACCCAAG--		1	0
Allele 1: Δ43	...GA-----CAAGAGGCCCCCTGGCCCAAGTGGT		1	1
Allele 2: Δ16	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGGGTCTGCAGGGT-----GGCCCAAGTGGT			
Allele 1: Δ19	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGG-----CCCCCCTGGCCCAAGTGGT		1	1
Allele 2: Δ1	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGGGTCTGCAGG-TCCAAGAGGCCCCCTGGCCCAAGTGGT			
Allele 1: Δ20	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATG-----AGGCCCCCTGGCCCAAGTGGT		1	1
Allele 2: Δ1	...GATTGAGGCTCATCAGTGCCCTCTCTATGTAGGGTCTGCAGG-TCCAAGAGGCCCCCTGGCCCAAGTGGT			

Figure 4 Indels in RDEB-E67A6 keratinocytes transduced with Ad-T6/T7. Thirty out of 113 clones analyzed had indels in the target site for the transcription activator-like nucleases pair T6-T7. Nineteen different indel mutations were found. The number of clones having each indel and the presence of indels in one or both alleles of *COL7A1* are shown on the right. RDEB, recessive dystrophic epidermolysis bullosa.

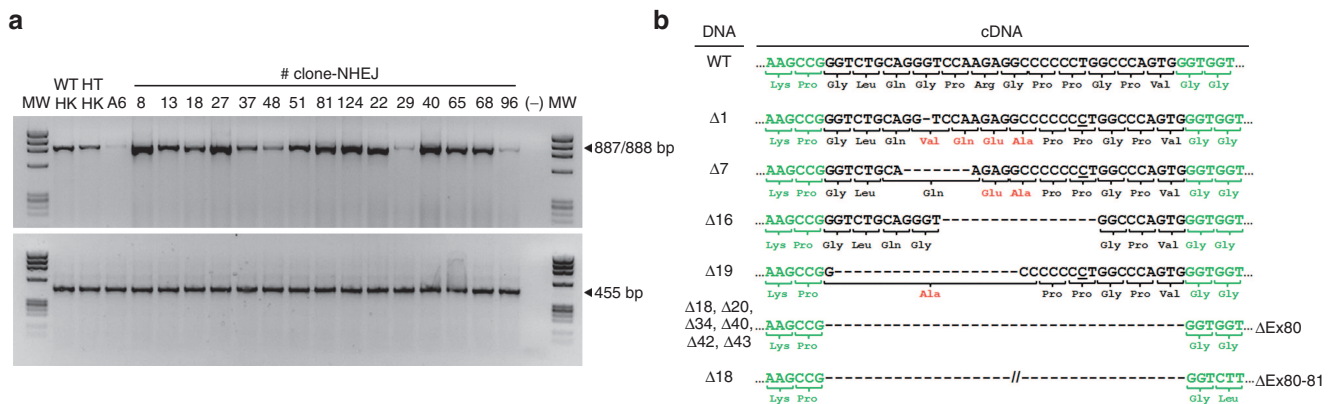


Figure 5 Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of *COL7A1* expression in NHEJ-corrected RDEB-E67A6 keratinocyte clones. *COL7A1* gene expression was analyzed by RT-PCR in one clone for each mutation or combination of mutations. High *COL7A1* transcript expression levels in relation to RDEB-E67A6 parental cell line were found, both in clones with frame-shifting indels causing frame restoration (clones 8, 13, 18, 27, 37, 48, 51, 124, and 22) and in clones with indels not leading to frame recovery (29, 40, 65, 68, and 96), compared to the RDEB-E67A6 parental cell line (A6). Normal human keratinocytes from an unaffected donor (HK) and a heterozygous carrier of the c.6527insC allele (HT) were used as controls of *COL7A1* physiological expression levels. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (455 bp) was used as a loading control (a). RT-PCR bands were cloned in plasmids and sequenced. Sequence of the transcripts corresponding to each indel in the region flanking the nuclease target site, and the ensuing changes in C7 aminoacid sequence, are shown (b). RDEB, recessive dystrophic epidermolysis bullosa.

after Ad-Cre infection, C7 was expressed in every corrected clone analyzed at levels comparable to control human keratinocytes. No expression was detected in RDEB-E67A6 parental cells or in clone 17, homologous recombinant without correction of the c.6527insC mutation included as a negative control. Consistent with the RT-PCR results, showing lack of expression of the corrected allele before neo selection cassette removal,

no C7 protein expression was found in corrected clones before Ad-Cre infection (Figure 6a, lower panels).

For NHEJ-mediated correction we analyzed by WB all clones carrying indel alleles, alone or in combination, that had been found to result in expression of re-framed *COL7A1* transcripts by frame shifting (Δ1, Δ7, Δ16 and Δ19) or exon skipping (Δ18, Δ20, Δ34, Δ43, Δ40, Δ42). We also analyzed clones with indels

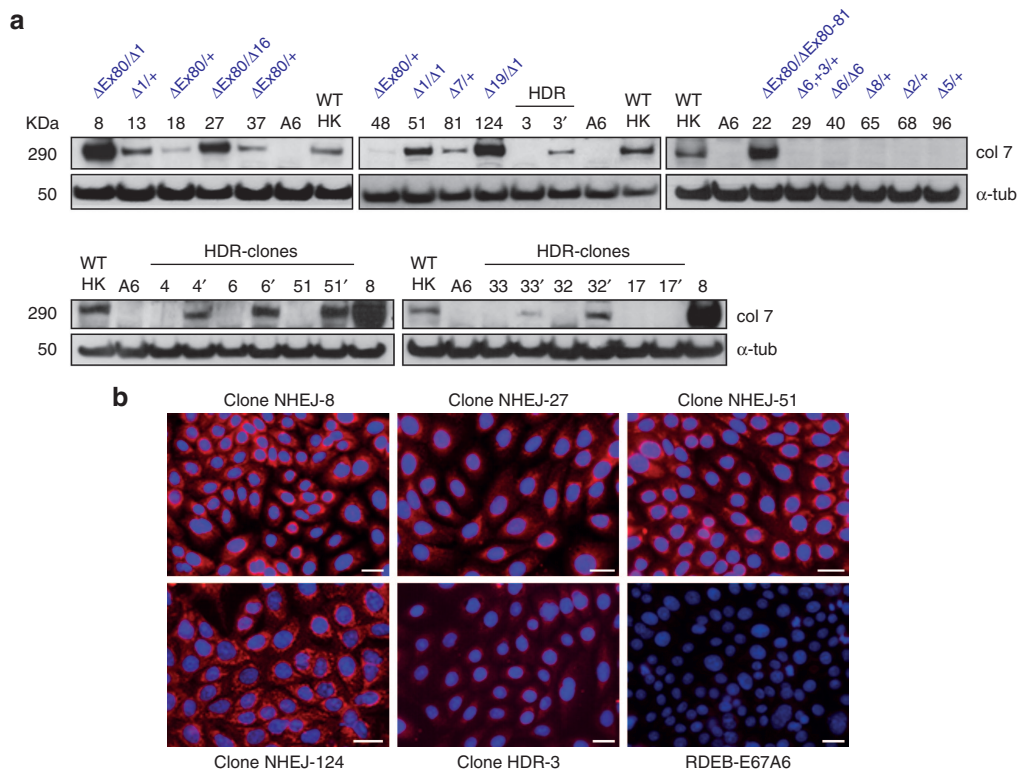


Figure 6 C7 protein expression in HDR and NHEJ-corrected RDEB-E67A6 keratinocyte clones. NHEJ (upper panels) and HDR (lower panels) corrected keratinocyte clone lysates were analyzed by Western blot to detect C7 expression. Clone numbers are shown above lanes. Indel genotypes for each NHEJ-corrected clone are shown above every clone number. For every HDR-corrected clone, cell lysates before (n) and after (n') neo cassette excision were analyzed (a). Immunofluorescence staining to detect C7 in cells from four NHEJ-corrected clones (NHEJ-8, 27, 51, and 124) and one HDR-corrected clone (HDR-3). RDEB-E67A6 parental cells are shown as negative control (b). Scale bar= 25 μm. HDR, homology-directed repair; NHEJ, nonhomologous end joining; RDEB, recessive dystrophic epidermolysis bullosa.

not leading to *COL7A1* reading frame restoration ($\Delta 6$ ins3, $\Delta 6$ homozygous, $\Delta 8$, $\Delta 2$ and $\Delta 5$). C7 protein expression was found in every clone expressing restored frame transcripts. Although the different indel-restored transcripts encode different truncated or mutated forms of C7, the estimated size of these proteins is very similar to full-length wild type C7 and a single band of apparently the same mobility was found for every clone (Figure 6a, upper panels). A remarkable overexpression of C7 protein was found in several clones, as compared to physiological expression levels in control human keratinocytes or HDR-corrected RDEB-E67A6 keratinocytes (Clone NHEJ-8 sample was included in the HDR-corrected clones gels for comparison of C7 amounts in HDR versus NHEJ correction). C7 overexpression was most pronounced in clones having both alleles restored, either in compound heterozygosity ($\Delta 19/\Delta 1$, $\Delta \text{Ex}80/\Delta 1$, $\Delta \text{Ex}80/\Delta 16$) or homozygosity ($\Delta 1/\Delta 1$, $\Delta 18/\Delta 18$) (Figure 6a).

Immunofluorescence was used to detect C7 in cells from four NHEJ-corrected clones and one HDR-corrected clone. Consistent with the western blot results, prominent cytoplasmic staining was detected in NHEJ-corrected cells as compared to HDR-corrected cells (Figure 6b).

In vivo analysis of C7 incorporation into the DEJ of gene-edited keratinocyte grafts

To determine whether production of C7 by *COL7A1* gene-edited cells results in C7 deposition in the dermo-epidermal junction

(DEJ) of skin, corrected clones of RDEB-E67A6 keratinocytes were used to generate skin equivalents, as described previously.²³ NHEJ-corrected clones 8 (indels $\Delta \text{Ex}80/\Delta 1$) and 37 ($\Delta \text{Ex}80$) that had shown by WB analysis high and low C7 expression levels respectively, and HDR-corrected clone 3/Cre, with expression levels comparable to human keratinocytes control, were used. For engraftment follow up, the cells were transduced with a GFP-expressing retroviral vector.²³ Eight weeks after transplantation onto immunodeficient mice, GFP-positive regenerated skins were excised for analysis.

Immunofluorescence analysis to detect the human C7 protein in graft sections using a human-specific anti C7 monoclonal antibody²⁶ showed a very strong signal in the DEJ of skin regenerated from clone NHEJ-8 keratinocytes. A weaker signal, comparable to control skin generated from control human keratinocytes, was observed in grafts generated from clones NHEJ-37 and HDR-3/Cre (Figure 7a).

Discussion

Cutaneous *ex vivo* gene therapy based on the specific correction of disease-causing mutations in epidermal stem cell clones can now be pursued by using new gene-editing methods. Targeting the epidermal stem cell will allow the generation of persistent corrected skin grafts with therapeutic utility for the treatment of monogenic genodermatoses such

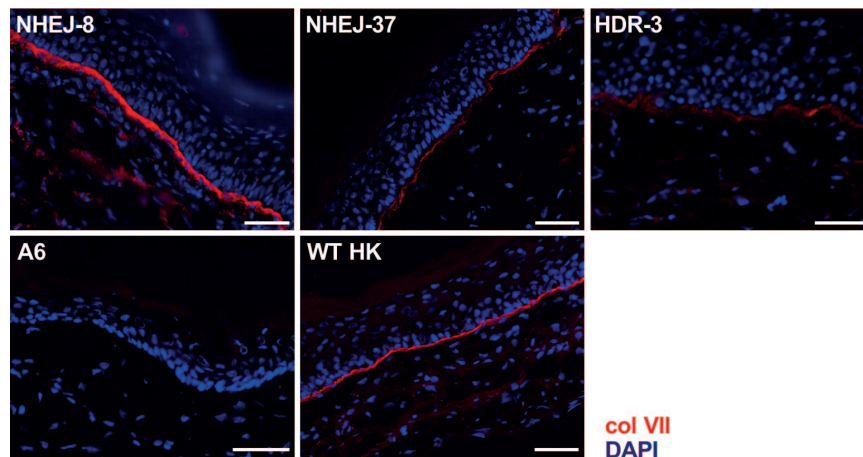


Figure 7 *In vivo* analysis of C7 incorporation into the dermo-epidermal junction of gene-edited RDEB-E67A6 keratinocyte grafts. Immunofluorescence staining for the detection of human C7 expression in sections of grafts from NHEJ-8, NHEJ-37, and HDR-3/Cre clones. Grafts from RDEB-E67A6 parental cells and wild-type human keratinocytes are shown as negative and positive controls respectively. Scale bar= 50 μ m. HDR, homology-directed repair; NHEJ, nonhomologous end joining; RDEB, recessive dystrophic epidermolysis bullosa.

as RDEB. We have previously achieved long-term engraftment of retroviral vector transduced-single human epidermal holoclones,²⁷ and this approach has been used by others for the correction of RDEB patient-derived human keratinocytes by gene replacement.²⁸ However, the potential genotoxicity risk and the very large size and repetitive nature of *COL7A1* cDNA are important hurdles for efficient transduction and expression of C7 protein with retroviral vectors. Implementation of precise and efficient gene-editing protocols will therefore be necessary to advance towards clinically meaningful DEB gene therapy.

Targeted gene addition in human epithelial stem cells by nuclease-mediated homologous recombination has been previously reported by our group. We combined IDLV-mediated delivery of donor DNA with adenoviral vector-mediated expression of zinc finger nucleases to execute the targeted integration of a GFP expression vector into the AAVS1 “safe harbor” locus in a small fraction of primary keratinocyte cells that, upon grafting, persisted as small foci in skin regenerated in immunodeficient mice.²⁹ We then achieved long-term skin regeneration from a single AAVS1 gene-targeted human epidermal stem cell clone.³⁰ Several groups have also addressed the correction of DEB by derivation of human keratinocytes from patient-derived iPS cells. Osborn *et al.*³¹ used TALEN-mediated targeted correction of patient fibroblasts and reprogrammed them to derive iPS cells that showed some potential as a source of keratinocytes in teratoma formation assays. Sebastiano *et al.* performed AAV vector-mediated HDR correction of iPS cells derived from DEB patients and subsequently differentiated them to human keratinocytes.³² In a similar fashion, iPS cells generated from naturally revertant keratinocytes from DEB patients were differentiated to keratinocytes.³³ However, the long term skin regeneration capacity and safety profile of human keratinocytes derived from iPS cells is still unknown. Achieving the correction of RDEB-causing mutations in human keratinocyte clones, with proven long-term skin regeneration ability and clinical relevance, would be highly preferable for translation to the clinical practice.

We have now developed gene-editing tools for the correction of a recurrent mutation accounting for 46% of DEB alleles in the Spanish DEB population. We have achieved a high percentage of gene correction by homologous recombination-mediated gene targeting in patient-derived immortalized keratinocytes by combining donor DNA delivery using AAV vectors with site-specific TALEN nucleases delivered with adenoviral vectors.

We explored the capability of two novel AAV2-derived vectors, Kera1 and Kera2, with engineered capsids specifically developed to efficiently transduce human keratinocytes³ to carry our targeting constructs and we found that both of them drove comparable, high rates of homologous recombination.

Although homologous recombination mediated by AAV vectors without the aid of site-specific nucleases has been reported in human keratinocytes¹⁰ we did not find any recombinants in the absence of nucleases (0 recombinant clones out of 98 rAAV-only controls analyzed). Importantly, in our experiments, genetic correction of the c.6527insC mutation was achieved in the majority of recombinant clones (32 of 34) and all corrected clones analyzed (a total of 19) expressed the *COL7A1* gene. These results show the potential of these new vectors for the development of gene targeting-based therapies of heritable skin diseases.

Randomly integrated AAV vectors proviruses are located at sites of spontaneous ds break formation³⁴ and this property of rAAVs has been used to identify nucleases off-target sites.³⁵ We have shown here that expression of TALE nucleases together with rAAV targeting constructs does not seem to result in increased off-target integrations, since most G418 resistant RDEB-E67A6 clones analyzed by Southern blotting with a neo probe had a single transgene integration, regardless of whether they had been transduced with AAV only or AAV plus TALENs.

In this study we have demonstrated that production of truncated or mutated forms of C7 in keratinocytes from c.6527 patients can be achieved efficiently and without antibiotic selection by generating indels in the *COL7A1* exon 80 sequence. After transduction with our adenoviral

vector-delivered TALENs, a high percentage (22 of 113, 19.5%) of RDEB-E67A6 keratinocyte clones carried indels compatible with frame restoration in at least one allele. All of the frame-restoring indel mutations resulted in *COL7A1* mRNA and C7 protein expression. Some of the indels were recurrent, with a single G deletion at the nuclease target site accounting for 30% of the mutations. Limited diversity of NHEJ-generated mutant alleles has been described before.³⁶ WB analysis showed remarkable C7 protein overexpression in several NHEJ-reframed clones, as compared to normal control keratinocytes. However, C7 protein expression in clones corrected by HDR was in the same range as in human control keratinocytes. These data suggest that NHEJ-mediated frame restoration, but not HDR-mediated correction, might result in upregulation of *COL7A1* expression, as indicated by increased *COL7A1* transcript levels in NHEJ-edited clones (Figure 5a). In addition, transcripts from NHEJ-edited alleles might be translated at a higher rate.

Although the relation between genotype and phenotype in RDEB is not always clear, a general rule can be drawn that the most severe forms of the disease are caused by PTC-causing mutations that result in the complete absence of C7, while mild or moderate forms of the disease are associated with missense or splice site mutations that result in the production of mutated or truncated C7 protein, even if the patient is a compound heterozygote carrying a PTC in the other allele.¹⁵ A mini C7 lacking part of its central collagenous domain retained the functions and characteristics of a full-length C7 α chain³⁷ and antisense oligoribonucleotide-mediated skipping of the exon 70 of *COL7A1*, containing a recurrent PTC mutation, achieved C7 re-expression in patient cells and resulted in the formation of anchoring fibrils.³⁸ We have shown here that human skin regenerated from a keratinocyte clone (NHEJ-8) carrying indels in the *COL7A1* gene that result in the production of two C7 protein variants, one with a substitution of four aminoacids and other with a truncation of 12 aminoacids within the C7 collagenous domain, displays C7 in the dermo-epidermal junction. Therefore, NHEJ-mediated correction of the c.6527insC mutation, resulting in the expression of truncated or altered forms of C7, might have the potential to correct the skin fragility phenotype, or at least shift the pathological phenotype from severe to mild.

We have shown the feasibility of efficiently correcting a recurrent RDEB causing mutation in human keratinocytes by gene-editing approaches with the aid of TALEN nucleases and non-integrating viral vectors. These molecular tools will allow the *ex vivo* manipulation of epidermal stem cells from a large cohort of RDEB patients to generate transplantable human skin for therapeutic purposes. Although achieving HDR-mediated correction of RDEB keratinocyte holoclones remains a challenging task, we have shown that NHEJ-mediated gene edition is a highly efficient alternative for the development of clonal gene therapy protocols.

Materials and methods

TALEN construction. TALE nucleases were constructed using the Golden Gate TALEN kit (Addgene, Cambridge, MA) as described in Cermak *et al.*²⁰ Destination vector

pCAG-T7-TALEN (Addgene) was used to generate TALEN proteins with N and C terminal truncations (+63 design). A destination vector designed to express a C-terminal deletion of HA-tagged TALE proteins fused to the FokI domain was generated by ligating an adapter into the AatII/EcoRV sites of pTAL3. The adapter was prepared by annealing oligos 5'-taccatcacgacgtcccagactacgcgat-3' and 5'-atcgtcgtgagctgggacgtcgtaggtgaacgt-3'. A BglII/AflII fragment from the resulting plasmid was cloned into BamHI/AflII sites of a plasmid containing the PGK promoter and polyadenylation sequences, to yield the final PGK-driven destination vector (+30+HA design, **Supplementary Figure S1**).

Cell (Surveyor) analysis of TALEN pairs activity. PCR fragments spanning the TALENs' target sites were generated with primers F1/R, F2/R and 80F/82R. F1: 5'-gtgagtggtggctgaagcac-3'; F2: 5'-tctgtgtgtgtgtgtatgtgga-3'; R: 5'-acccaccaaggaactga-3'; 80F: 5'-caagtggagccagattgag-3'; 82R: 5'-ggcatggacacagcttgaag-3'. PCR products were subjected to melting and reannealing to form heteroduplexes and homoduplexes, digested with Surveyor nuclease (Transgenomic, Omaha, NE) at 42 °C for 1 hour, resolved in 1.5% agarose gels, and visualized by ethidium bromide staining. Molecular weight marker was IX (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Percentage of cleaved DNA was calculated by using the following formula: % cleaved = $((b + c)/(a + b + c)) \times 100$, where *a* is the integrated intensity of the undigested PCR product and *b* and *c* are the integrated intensities of each cleavage product.

Adenoviral vectors. Recombinant serotype 5 adenoviral vectors were produced by site-specific recombination between Ad5 genome-containing pBHGlloxΔE1, 3Cre plasmid, and shuttle plasmids pDC315-TALEN-iresGFP after their cotransfection into 293 cells.³⁹ Shuttle vectors were constructed by cloning a NheI/EcoRI fragment, comprising the PGK promoter and TALEN coding sequences, from the TALEN expression vectors with the +30+HA design into XbaI/EcoRI sites of pDC315iGFP plasmid. After calcium phosphate-mediated transfection of both plasmids, 293 cells were embedded in agarose medium (0.5% agarose in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 10% fetal bovine serum) and observed for plaque appearance. When plaques reached 2–3 mm in diameter, they were isolated by punching out agar plugs with a Pasteur pipette and eluted in 1 ml of 1× phosphate-buffered saline (PBS) ^{+/+} with 10% glycerol for –80 °C storage. For virus expansion, a subconfluent 60-mm dish of 293 cells was adsorbed with 400 microliters of plaque picks for 1 hour. Following adsorption, 5 ml of MEM+5% horse serum was added and incubated until complete cytopathic effect was observed. Cells were then harvested by gentle pipetting and genomic DNA was extracted from the cellular pellet and digested with HindIII for restriction digestion analysis of the viral genome. Supernatants were frozen at –80 °C after adding glycerol to 10%, and used for later preparation of large scale stocks once the DNA structure of the recombinant virus was verified. 150-mm dishes of subconfluent 293 cells were infected with the supernatants. Once cytopathic effect was observed, cells were harvested by gentle pipetting; cellular pellets were resuspended in DMEM and lysed by subjecting them to three cycles of freezing and thawing. The lysate was added on top

of a cesium chloride gradient in SW40 tubes and centrifuged at 35,000 rpm at 10 °C for 3 hours. The band containing the viruses was collected by piercing the side of the tube with a needle and syringe. The viruses were then purified in PD10 columns (Amersham, Burlington, MA) and concentration of viral particles based on DNA content was determined as follows: $OD_{260} \times \text{dilution factor} \times 1.1 \times 10^{12} = \text{viral particles/ml}$.

Adeno-associated virus vector construction. DNA fragments containing COL7A1 homology arms were PCR amplified using BAC RP11-148G20 as a template with primers Col7KI-B1-F: 5'-gcgccgcggactggatgggaac-3' and Col7KI-B1-R: 5'-gctagcaagcttagcacacacggcctgcac-3' for left arm, and Col7KI-B2-F: 5'-ggatcctctatgagaggcagtccttg-3' and AAV-Br2-R: 5'-actagtggagaaactcagtcctc-3' for right arm, and cloned in the pGEM-T vector (Promega, Madison, WI) for sequence verification. To facilitate genotyping, a KpnI site was introduced into the right arm by using Quikchange site directed mutagenesis kit (Agilent, Santa Clara, CA) with primers F: 5'-gtgccctgccccaggtaccagtactgccttcag-3' and complementary reverse primer. A BamHI/EcoRI fragment containing the right arm, and a NotI/HpaI fragment for the left arm, were sequentially cloned in pLoxP plasmid, containing the floxed PGK-neo cassette. A SpeI/SpeI fragment from the resulting plasmid was cloned in the XbaI sites of pSub201 plasmid,⁴⁰ containing the AAV ITRs, to produce the AAV-PGKneo construct. The gene trap cassette (SA-2A-neo) was constructed by overlapping PCR of fragments containing a splice acceptor sequence from the first intron of mouse N4bp1 gene, a 2A peptide sequence and a neo resistance sequence. Overlapping fragments were constructed with the following primers: a splice acceptor-containing fragment (SA) of 248bp was amplified with SA-F: 5'-gggcccactctgtaaattatacaaaag-3' and SA-R: 5'-aggaccgggggttttctcc-3', using a previous construct containing a SA-2A fusion as a template; 2A peptide-ATG less neo fragment was amplified with 2A-F: 5'-gaagaaaaccccggtccttgattgaac-3' and 2A-R: 5'-ctcaccataggaccggggttttcttc-3', using a previous construct containing 2A-neo as a template. The PCR-mediated fusion of both fragments was performed using primers SA-F and 2A-R. The PCR product was cloned in pGEM-T and verified by sequencing. An XhoI/RsrII fragment containing the gene trap neo cassette was cloned into XhoI/RsrII sites of AAV-PGKneo to generate the AAV-SA-2A-neo construct.

Production of AAV targeting vectors. HEK293 cells were cotransfected with a total of 37.5 micrograms of pRC-Kera1 or pRC-Kera2, AAV-PGKneo or AAV-SA-2A-neo construct, and pXX6.⁴¹ Cells were harvested 48 hours post-transduction, lysed and purified by iodixanol density step gradient centrifugation.⁴² Particle titer (vector genomes per microliter) was determined by qPCR (LightCycler System, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) from vector genomes isolated by DNeasy Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) from vector preparations using neo-specific primers.

Genotyping for detection of homologous recombinants. Genomic DNA was isolated by isopropanol precipitation of keratinocytes lysates (lysis buffer was Tris pH8 100 mmol/l, ethylene diamine tetra acetic acid 5 mmol/l, sodium dodecyl

sulfate 0.2%, NaCl 200 mmol/l, 1 mg/ml proteinase K (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)) and resuspended in Tris-EDTA buffer. Approximately 100 ng of genomic DNA were used for PCR genotyping. Targeted integration was assessed by PCR (Expand Long Template PCR system, Roche Diagnostics) using primers specific for human genomic sequence flanking the homology region present in the targeting construct 1: 5'-cctcctggactccttgaac-3' and 4: 5'-tctccttaggtccgacaggg-3'. PCR program was: 94 °C for 1 minute, 10 cycles of 94 °C for 10 seconds, 55 °C for 30 seconds, 68 °C for 1 minute and 50 seconds, followed by 25 cycles of 94 °C for 10 seconds, 55 °C for 30 seconds, 68 °C for 1 minute and 50 seconds with 15 seconds/cycle increments, then 68 °C for 7 minutes. Targeted integration 5' junction was assessed with primers 1 and 2A: 5'-taccggtagaattgacatgc-3' for the PGKneo-based targeting construct and 1 and 2B: 5'-tgtgtgtgaggctattgtctgtt-3' for the SA-2A gene trap-based targeting construct, and 3' junction was assessed with primers 3: 5'-aatgtgtcagttcatagcctg-3 and 4. PCR products were resolved on 1% agarose gels and visualized by ethidium bromide staining.

For Southern blot analysis, approximately 10 µg of genomic DNA were digested with Hind III, separated on a 0.8% agarose gel, transferred to a nylon membrane (Amersham XL, Amersham, Burlington, MA) by alkaline transfer and probed with P³²-labeled probes. Probes were generated by PCR, cloned in pGEM-T (Promega) easy and verified by sequencing. The 5' probe was made with primers 5'probeF: 5'-cccagcaggttctacctg-3' and 5'probeR: 5'-aagcttttctcgtctgggctc-3' using human genomic DNA as a template and the neo probe with primers 2AF: 5'-gaagaaaaccccggtccttgattgaac-3' and Neo R: 5'-gcactcgcccaatagca-3' using the AAV-SA-2A-neo targeting construct as a template.

RT-PCR analysis. Total RNA was extracted from keratinocytes with miRNeasy Mini Kit (Qiagen), and complementary DNA (cDNA) was synthesized using the SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA). The following primers: F: 5'-ctgtgctggccctggggagag-3' and R: 5'-cttctctcccttgctccaggg-3', were used to amplify a 887-bp fragment spanning exons 73–88 of COL7A1. The PCR conditions were: step 1: 94 °C 3 minutes; step 2: 94 °C 45 seconds, 68 °C 30 seconds, 72 °C 1 minute, 10 cycles with 1 °C decrease of annealing temperature in each cycle; step 3: 94 °C 45 seconds 63 °C 30 seconds 72 °C 1 minute, 25 cycles; step 4: 72 °C 10 minutes. The human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene was analyzed as a loading control with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-specific primers: F: 5'-accacagtcctatgcatcac-3' and R: 5'-tccaccaccctgtgtgt-3'.

Western blot analysis. Keratinocytes were grown to confluence and lysed in protein extraction buffer (50 mmol/l Tris-HCl, pH 7.5, 100 mmol/l NaCl, 1% Nonidet P-40, 4 mmol/l ethylene diamine tetra acetic acid) containing proteinase inhibitors cocktail (Complete Mini, ethylene diamine tetra acetic acid-free; Roche Diagnostics). Lysates were incubated for 30 minutes on ice and centrifuged at 15,000×g for 30 minutes at 4 °C. Supernatants were collected and protein concentrations were measured using the Bradford assay (BioRad, Hercules,

CA). For each sample, 50 µg of total protein was resolved on NuPAGE Novex 3–8% Tris-Acetate gel electrophoresis (Invitrogen) and electrotransferred to nitrocellulose membranes (Invitrogen). For type VII collagen analysis, blots were probed with anti-type VII collagen polyclonal antibody (Calbiochem, San Diego, CA) diluted at 1:50. Antibody against α -tubulin (Sigma Aldrich, St Louis, MO) was used as a loading control. For detection of HA-tagged TALENs transfected in 293T cells, a 1/1000 dilution of anti HA tag 16B12 mouse monoclonal antibody (Biolegend, San Diego, CA) was used. Visualization was performed by incubating with horse radish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (Amersham) and West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Rockford, IL).

Sequencing. Plasmids and PCR products were sequenced using Big Dye Terminator V.1.1 Cycle Sequencing kit and examined on a 3730 DNA Analyser (Life Technologies, Carlsbad, CA). Sequences were analyzed using Sequencher (Gene Codes, Ann Harbor, MI) and Poly Peak Parser software packages.²⁵

Cell culture, transfections, transduction with viral vectors, and cloning. RDEB-E67A6 keratinocytes were cultured in Kci medium (2:1 DMEM) (GIBCO-BRL, Barcelona, Spain)/HAM'S F12 (GIBCO-BRL) containing 10% Hyclone fetal bovine calf serum (GE Healthcare, Logan, UT), 0.1 nmol/l cholerich toxin (Sigma Aldrich) 2 nmol/l T3 (Sigma Aldrich), 5 microg/ml insulin (Sigma Aldrich), 0.2 µg/ml hydrocortisone (Sigma Aldrich), 12 microg/ml adenine (Sigma Aldrich), 0.2% Primocin (Sigma Aldrich) as previously described.²³ For viral vector transduction, cells were trypsinized and infected in suspension with AAV targeting vector constructs (MOI: 30,000) and TALEN-expressing adenoviral vectors (MOI: 1,000) in the presence of polybrene (8 µg/ml) (Sigma Aldrich). 1×10^6 transduced cells were plated in a 35-mm dish without feeder layer and cultured for 48–72 hours. Cells were then trypsinized and plated in ten 100-mm plates with 2×10^6 lethally irradiated 3T3 feeder cells per plate. When cell clones were visible, G418 (100 µg/ml) (GIBCO-BRL) was added to the medium. After 10 days of antibiotic selection, resistant clones were collected using cloning cylinders (Sigma Aldrich) and expanded for cryopreservation and genomic DNA extraction. HEK293T cells were cultured in DMEM 10% FCS and transfected with 5 µg of TALEN-expressing constructs using the calcium phosphate coprecipitation method.

Immunofluorescence staining. For immunofluorescence detection of human C7 in gene-edited RDEB-E67A6 keratinocytes or in skin grafts, cells grown on glass cover slips or 7 µm frozen sections of grafted skin tissue were fixed in methanol/acetone (1:1) for 10 minutes at -20°C . After washing three times in PBS and once in PBS with 3% bovine serum albumin (Sigma Aldrich) for 30 minutes, cells or cryosections were incubated with LH7.2 monoclonal antibody (Sigma Aldrich) for 1 hour in a humidified chamber at room temperature. Secondary antibody (AlexaFluor594, Invitrogen) was used at 1/1,000 dilution. After the final washing step in PBS, preparations were mounted using Mowiol (Hoechst, Somerville, NJ) mounting medium and 46-diamidino-2-phenyl indole $20 \mu\text{gml}^{-1}$ (Sigma Aldrich) for nuclei visualization. For detection of TALENs transfected in 293T cells, cells grown on

glass cover slips and fixed with 4% paraformaldehyde for 10 minutes were incubated with a 1/1,000 dilution of anti HA tag mouse monoclonal antibody 16B12 (Biolegend) following the same protocol as described above.

Generation of skin equivalents and grafting onto immunodeficient mice. RDEB-E67A6 keratinocytes (2.5×10^5 cells) were seeded on RDEB fibroblasts-containing fibrin dermal equivalents prepared as previously described.⁴³ Bioengineered skin equivalents were grafted onto the back of immunodeficient nu/nu mice ($n = 3$) according to Del Rio *et al.*⁴⁴ including the step of retrovirus-mediated enhanced green fluorescent protein cell labelling. Engraftment was monitored by enhanced green fluorescent protein fluorescence visualization. Eight weeks after grafting, mice were sacrificed and grafts harvested for skin immunofluorescence analysis. Animal studies were approved by our institutional animal care and use committee according to all legal regulations.

Supplementary material

Figure S1. TALEN pairs targeting the *COL7A1* exon 80 region.

Figure S2. Expression of TALEN proteins and functionality of TALEN pairs transfected in 293T cells.

Figure S3. Expression of TALEN proteins in RDEB-E67A6 keratinocytes transduced with Ad-TALENs vectors.

Figure S4. AAV targeting vectors.

Figure S5. PCR genotyping by amplification of selection cassette-genome junctions.

Figure S6. *COL7A1/2A*-neo fusion transcript in recombinant clones obtained by transduction with the SA-2A-neo-AAV vector.

Figure S7. Genotyping c.6527insC mutation correction.

Figure S8. Neo selection cassette excision.

Figure S9. *COL7A1* alleles expression in HDR-targeted RDEB-E67A6 clones analyzed by T-A cloning and sequencing.

Figure S10. Sequence analysis of the nuclease target region in clones of RDEB-E67A6 keratinocytes transduced with T6/T7 TALENs.

Figure S11. *COL7A1* alleles expression in NHEJ-mutated RDEB-E67A6 clones analyzed by T-A cloning and sequencing.

Acknowledgments This work was supported in part by grants SAF2014-54885-R from MINECO to MDR; S2010/BMD-2420 and S2010/BMD-2359 from Dirección General de Investigación de la Comunidad de Madrid to MDR and FL respectively; PI14/00931 from Instituto de Salud Carlos III to FL and by funding from Center for Molecular Medicine Cologne (CMMC) of the University of Cologne to H.B. There are no conflicts of interest.

1. Cox, DB, Platt, RJ and Zhang, F (2015). Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med* 21: 121–131.
2. Khan, IF, Hirata, RK and Russell, DW (2011). AAV-mediated gene targeting methods for human cells. *Nat Protoc* 6: 482–501.
3. Sallach, J, Di Pasquale, G, Larcher, F, Niehoff, N, Rübsam, M, Huber, A *et al.* (2014). Tropism-modified AAV vectors overcome barriers to successful cutaneous therapy. *Mol Ther* 22: 929–939.

4. Rio, P, Baños, R, Lombardo, A, Quintana-Bustamante, O, Alvarez, L, Garate, Z *et al.* (2014). Targeted gene therapy and cell reprogramming in Fanconi anemia. *EMBO Mol Med* **6**: 835–848.
5. Biffi, A (2015). Clinical translation of TALENS: Treating SCID-X1 by gene editing in iPSCs. *Cell Stem Cell* **16**: 348–349.
6. Tebas, P, Stein, D, Tang, WW, Frank, I, Wang, SQ, Lee, G *et al.* (2014). Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N Engl J Med* **370**: 901–910.
7. Mingozzi, F and High, KA (2011). Therapeutic *in vivo* gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat Rev Genet* **12**: 341–355.
8. Chamberlain, JR, Deyle, DR, Schwarze, U, Wang, P, Hirata, RK, Li, Y *et al.* (2008). Gene targeting of mutant COL1A2 alleles in mesenchymal stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta. *Mol Ther* **16**: 187–193.
9. Petek, LM, Fleckman, P and Miller, DG (2010). Efficient KRT14 targeting and functional characterization of transplanted human keratinocytes for the treatment of epidermolysis bullosa simplex. *Mol Ther* **18**: 1624–1632.
10. Melo, SP, Lisowski, L, Bashkurova, E, Zhen, HH, Chu, K, Keene, DR *et al.* (2014). Somatic correction of junctional epidermolysis bullosa by a highly recombinogenic AAV variant. *Mol Ther* **22**: 725–733.
11. Händel, EM, Gellhaus, K, Khan, K, Bednarski, C, Cornu, TI, Müller-Lerch, F *et al.* (2012). Versatile and efficient genome editing in human cells by combining zinc-finger nucleases with adeno-associated viral vectors. *Hum Gene Ther* **23**: 321–329.
12. Miller, DG, Petek, LM and Russell, DW (2003). Human gene targeting by adeno-associated virus vectors is enhanced by DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol* **23**: 3550–3557.
13. Porteus, MH, Cathomen, T, Weitzman, MD and Baltimore, D (2003). Efficient gene targeting mediated by adeno-associated virus and DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol* **23**: 3558–3565.
14. Tolar, J and Wagner, JE (2015). A biologic Velcro patch. *N Engl J Med* **372**: 382–384.
15. Escámez, MJ, García, M, Cuadrado-Corrales, N, Llamas, SG, Charlesworth, A, De Luca, N *et al.* (2010). The first COL7A1 mutation survey in a large Spanish dystrophic epidermolysis bullosa cohort: c.6527insC disclosed as an unusually recurrent mutation. *Br J Dermatol* **163**: 155–161.
16. Ousterout, DG, Perez-Pinera, P, Thakore, PI, Kabadi, AM, Brown, MT, Qin, X *et al.* (2013). Reading frame correction by targeted genome editing restores dystrophin expression in cells from Duchenne muscular dystrophy patients. *Mol Ther* **21**: 1718–1726.
17. Ousterout, DG, Kabadi, AM, Thakore, PI, Perez-Pinera, P, Brown, MT, Majoros, WH *et al.* (2015). Correction of dystrophin expression in cells from Duchenne muscular dystrophy patients through genomic excision of exon 51 by zinc finger nucleases. *Mol Ther* **23**: 523–532.
18. Christiano, AM, Hoffman, GG, Chung-Honet, LC, Lee, S, Cheng, W, Uitto, J *et al.* (1994). Structural organization of the human type VII collagen gene (COL7A1), composed of more exons than any previously characterized gene. *Genomics* **21**: 169–179.
19. Doyle, EL, Booher, NJ, Standage, DS, Voytas, DF, Brendel, VP, Vandyk, JK *et al.* (2012). TAL effector-nucleotide targeter (TALE-NT) 2.0: tools for TAL effector design and target prediction. *Nucleic Acids Res* **40**(Web Server issue): W117–W122.
20. Cermak, T, Doyle, EL, Christian, M, Wang, L, Zhang, Y, Schmidt, C *et al.* (2011). Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res* **39**: e82.
21. Miller, JC, Tan, S, Qiao, G, Barlow, KA, Wang, J, Xia, DF *et al.* (2011). A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol* **29**: 143–148.
22. Qiu, P, Shandilya, H, D'Alessio, JM, O'Connor, K, Durocher, J and Gerard, GF (2004). Mutation detection using Surveyor nuclease. *Biotechniques* **36**: 702–707.
23. Chamorro, C, Almaraz, D, Duarte, B, Llamas, SG, Murillas, R, García, M *et al.* (2013). Keratinocyte cell lines derived from severe generalized recessive epidermolysis bullosa patients carrying a highly recurrent COL7A1 homozygous mutation: models to assess cell and gene therapies *in vitro* and *in vivo*. *Exp Dermatol* **22**: 601–603.
24. Fritsch, A, Loeckermann, S, Kern, JS, Braun, A, Bosl, MR, Bley, TA, *et al.* (2008). A hypomorphic mouse model of dystrophic epidermolysis bullosa reveals mechanisms of disease and response to fibroblast therapy. *J Clin Invest* **118**: 1669–1679.
25. Hill, JT, Demarest, BL, Bisgrove, BV, Su, YC, Smith, M and Yost, HJ (2014). Poly peak parser: Method and software for identification of unknown indels using sanger sequencing of polymerase chain reaction products. *Dev Dyn* **243**: 1632–1636.
26. Leigh, IM, Eady, RA, Heagerty, AH, Purkis, PE, Whitehead, PA and Burgeson, RE (1988). Type VII collagen is a normal component of epidermal basement membrane, which shows altered expression in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* **90**: 639–642.
27. Larcher, F, Dellambra, E, Rico, L, Bondanza, S, Murillas, R, Cattoglio, C *et al.* (2007). Long-term engraftment of single genetically modified human epidermal holoclones enables safety pre-assessment of cutaneous gene therapy. *Mol Ther* **15**: 1670–1676.
28. Droz-Georget Lathion, S, Rochat, A, Knott, G, Recchia, A, Martinet, D, Benmohammed, S *et al.* (2015). A single epidermal stem cell strategy for safe ex vivo gene therapy. *EMBO Mol Med* **7**: 380–393.
29. Coluccio, A, Miselli, F, Lombardo, A, Marconi, A, Malagoli Tagliacucchi, G, Gonçalves, MA *et al.* (2013). Targeted gene addition in human epithelial stem cells by zinc-finger nuclease-mediated homologous recombination. *Mol Ther* **21**: 1695–1704.
30. Duarte, B, Miselli, F, Murillas, R, Espinosa-Hevia, L, Cigudosa, JC, Recchia, A *et al.* (2014). Long-term skin regeneration from a gene-targeted human epidermal stem cell clone. *Mol Ther* **22**: 1878–1880.
31. Osborn, MJ, Starker, CG, McElroy, AN, Webber, BR, Riddle, MJ, Xia, L *et al.* (2013). TALEN-based gene correction for epidermolysis bullosa. *Mol Ther* **21**: 1151–1159.
32. Sebastiano, V, Zhen, HH, Haddad, B, Derafsi, BH, Bashkurova, E, Melo, SP *et al.* (2014). Human COL7A1-corrected induced pluripotent stem cells for the treatment of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Sci Transl Med* **6**: 264ra163.
33. Umegaki-Arao, N, Pasmooij, AM, Itoh, M, Cerise, JE, Guo, Z, Levy, B *et al.* (2014). Induced pluripotent stem cells from human revertant keratinocytes for the treatment of epidermolysis bullosa. *Sci Transl Med* **6**: 264ra164.
34. Miller, DG, Petek, LM and Russell, DW (2004). Adeno-associated virus vectors integrate at chromosome breakage sites. *Nat Genet* **36**: 767–773.
35. Petek, LM, Russell, DW and Miller, DG (2010). Frequent endonuclease cleavage at off-target locations *in vivo*. *Mol Ther* **18**: 983–986.
36. Gagnon, JA, Valen, E, Thyme, SB, Huang, P, Akhmetova, L, Akhmetova, L *et al.* (2014). Efficient mutagenesis by Cas9 protein-mediated oligonucleotide insertion and large-scale assessment of single-guide RNAs. *PLoS One* **9**: e98186.
37. Chen, M, O'Toole, EA, Muellenhoff, M, Medina, E, Kasahara, N and Woodley, DT (2000). Development and characterization of a recombinant truncated type VII collagen “minigene”. Implication for gene therapy of dystrophic epidermolysis bullosa. *J Biol Chem* **275**: 24429–24435.
38. Goto, M, Sawamura, D, Nishie, W, Sakai, K, McMillan, JR, Akiyama, M *et al.* (2006). Targeted skipping of a single exon harboring a premature termination codon mutation: implications and potential for gene correction therapy for selective dystrophic epidermolysis bullosa patients. *J Invest Dermatol* **126**: 2614–2620.
39. Ng, P and Graham, FL (2002). Construction of first-generation adenoviral vectors. *Methods Mol Med* **69**: 389–414.
40. Samulski, RJ, Chang, LS and Shenk, T (1987). A recombinant plasmid from which an infectious adeno-associated virus genome can be excised *in vitro* and its use to study viral replication. *J Virol* **61**: 3096–3101.
41. Xiao, X, Li, J and Samulski, RJ (1998). Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol* **72**: 2224–2232.
42. Hacker, UT, Wingenfeld, L, Kofler, DM, Schuhmann, NK, Lutz, S, Herold, T *et al.* (2005). Adeno-associated virus serotypes 1 to 5 mediated tumor cell directed gene transfer and improvement of transduction efficiency. *J Gene Med* **7**: 1429–1438.
43. Llamas, SG, Del Rio, M, Larcher, F, García, E, García, M, Escamez, MJ *et al.* (2004). Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. *Transplantation* **77**: 350–355.
44. Del Rio, M, Larcher, F, Serrano, F, Meana, A, Muñoz, M, García, M *et al.* (2002). A preclinical model for the analysis of genetically modified human skin *in vivo*. *Hum Gene Ther* **13**: 959–968.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Supplementary Information accompanies this paper on the Molecular Therapy–Nucleic Acids website (<http://www.nature.com/mtna>)

